(19) 世界知的所有権機関 国際事務局



(43) 国際公開日 2003 年3 月13 日 (13.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号 WO 03/020932 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 38/17, 39/395, A61P 25/00, 43/00, C07K 16/18, C12P 21/02, G01N 33/50, 33/15

(21) 国際出願番号:

PCT/JP02/08872

(22) 国際出願日:

2002 年9 月2 日 (02.09.2002)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

JP

Љ

(30) 優先権データ:

特願2001-265829 2001年9月3日(03.09.2001) JP 特願2001-294586 2001年9月26日(26.09.2001) JP 特願2001-388011

2001年12月20日(20.12.2001)

特願 2001-401948

2001年12月28日(28.12.2001) 2002年1月24日(24.01.2002)

特願2002-015976 2002 年1 月24 日 (24.01.2002) JP 特願2002-088383 2002 年3 月27 日 (27.03.2002) JP

(71) 出願人 *(*米国を除く全ての指定国について*)*: 成田薬品 工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修

町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 日沼州司 (HINUMA,Shuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-1402号 Ibaraki (JP). 福住昌司 (FUKUSUMI,Shoji) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市並木3丁目17番地6-302号 Ibaraki (JP). 小松秀俊 (KOMATSU,Hidetoshi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市春日1丁目7番地9-803号 Ibaraki (JP). 藤井亮 (FUJII,Ryo) [JP/JP]; 〒305-0821 茨

城県 つくば市 春日 2 丁目 3 3 番地 1 6 Ibaraki (JP). 北田 千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP]; 〒590-0073 大阪府 堺市 南向陽町 1 丁 2 番 8 号 Osaka (JP). 細谷昌樹 (HOSOYA, Masaki) [JP/JP]; 〒300-0007 茨城県 土浦市 板谷 1 丁目 7 1 1 番地の 8 3 Ibaraki (JP). 羽畑 祐晋 (HABATA, Yugo) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市 並木 3 丁目 1 7 番地 1 - 6 0 6 号 Ibaraki (JP). 原田 征隆 (HARADA, Masaka) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県 つくば市 東 2 丁目 1 番地 5 - 2 0 1 Ibaraki (JP). 野口 優子 (NOGUCHI, Yuko) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つくば市 二の宮 4 丁目 1 3 - 1 2 - 3 0 1 Ibaraki (JP).

- (74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI,Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目 1 7番85号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広城): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ 特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

-- 国際調査報告書

/続葉有/

(54) Title: NOVEL SECRETORY PROTEINS AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規分泌蛋白質およびそのDNA

(57) Abstract: Secretory proteins having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by, for example, SEQ ID NO:23 are useful physiologically active substances binding to AQ27 receptor.

(57) 要約:

配列番号:23などで表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質は、AQ27受容体と結合する有用な生理活性物質である。



WO 03/020932 A1

2文字コード及び他の略語については、定期発行される 各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語 のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規分泌蛋白質およびそのDNA

5 技術分野

本発明は、新規な分泌蛋白質、そのDNAおよびそれらの用途、および新規なAQ27受容体、そのDNAおよびそれらの用途に関する。

背景技術

15

10 近年、ヒトゲノムDNAあるいは各種ヒト組織由来の c DNAのランダムな 配列決定による配列情報の蓄積および遺伝子解析技術の急速な進歩によってヒ トの遺伝子が加速度的に解明されてきている。それにともない、機能未知の蛋 白をコードすると予想される多くの遺伝子の存在が明らかになっている。

WO01/16313号には、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるAQ27およびそのDNAが記載されている。

WOOO/29441号には、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるOT7T022およびそのDNAが記載されており、OT7T022に結合するリガンドとしてRFRP (RF related peptide) が記載されている。

WO01/66134号公報には、上記RFRPがプロラクチン分泌調節 20 作用を有することが記載されている。

本発明は、新規な分泌蛋白質、そのDNAおよびそれらの用途、および新規なAQ27受容体、そのDNAおよびそれらの用途などを提供する。

発明の開示

25 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト全 脳等から分泌シグナルを含む新規なペプチドをコードする 9 種類のDNAを取得することに成功し、このDNAに分泌ペプチドがコードされていることを見い出した。さらに、本発明者らは、マウスおよびラット由来のAQ27受容体をコードする 9 種類のDNAを取得することに成功した。本発明者らは、これ

- らの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。 すなわち、本発明は、
- (1)配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (2)配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (3)上記(1)記載の分泌蛋白質の部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 10 (4) 上記(1) 記載の分泌蛋白質の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはその エステルまたはその塩、
 - (5)配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(4)記載の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 15 (6)配列番号:2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (7)上記(1)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有する ポリヌクレオチド、
- (8)配列番号: 7で表わされる塩基配列からなる上記(7)記載のポリヌク 20 レオチド、
 - (9) 上記 (3) 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、・
 - (10)上記(4)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- 25 (11)配列番号:8で表わされる塩基配列からなる上記(10)記載のポリ ヌクレオチド、
 - (12)上記(7)~(11)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
 - (13) 上記(12) 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

- (14)上記(13)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、
- 5 (15) 上記(1) 記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、
 - (16)上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(15)記載の抗体、
- 10 (17)上記(15)記載の抗体を含有してなる医薬、
 - (18) 上記(15) 記載の抗体を含有してなる診断薬、
 - (19)上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、
- 15 (20)上記(7)~(11)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
 - (21) 上記 (7) \sim (11) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、
- (22)上記(7)~(11)のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的 20 な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、
 - (23)上記(22)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
 - (24)上記(22)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤、
- 25 (25)上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15

20

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

(26)上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを 特徴とする上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体 蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻 害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(27) 上記(25) 記載のスクリーニング方法または上記(26) 記載のス クリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)記載の分泌蛋白質、そ の部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエス テルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩、

(28)上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 10 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進また は阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(29) 上記(7)~(11) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いる ことを特徴とする上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその 前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を 促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(30)上記(7)~(11)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有す ることを特徴とする上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはそ の前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現 を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(31) 上記(29) 記載のスクリーニング方法または上記(30) 記載のス クリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)記載の分泌蛋白質、そ の部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエス テルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(32)上記(1)記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 25 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進また は阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(33)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~112番目の アミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特

徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

- (34)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~112番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 5 (35)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~37番目のアミノ酸配列または第40番目~55番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (36)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~37番目のア 10 ミノ酸配列または第40番目~55番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そ のアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (37)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチドの 部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (38)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (39) 配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(38)記載の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (40) 配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、その 20 アミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (41)上記(33)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
 - (42)配列番号:9で表わされる塩基配列の第64番目~336番目の塩基配列からなる上記(41)記載のポリヌクレオチド、
- 25 (43) 上記(35) 記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
 - (44) 配列番号: 9 で表わされる塩基配列の第64番目 \sim 111番目の塩基配列または第118番目 \sim 165番目の塩基配列からなる上記(43) 記載のポリヌクレオチド、

- (45)上記(37)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- (46)上記(38)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- 5 (47)配列番号:9で表わされる塩基配列からなる上記(46)記載のポリ ヌクレオチド、
 - (48) 上記 (41) ~ (47) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
 - (49) 上記(48) 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- 10 (50)上記(49)記載の形質転換体を培養し、上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、
- 15 (51)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、
- (52)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(51)記載の 抗体、
 - (53)上記(51)記載の抗体を含有してなる医薬、
 - (54)上記(51)記載の抗体を含有してなる診断薬、
 - (55)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、
- 25 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、
 - (56)上記(41) \sim (47)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
 - (57) 上記(41)~(47) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有

してなる診断剤、

- (58)上記(41)~(47)のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補 的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、
- (59)上記(58)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医 5 薬、
 - (60)上記(58)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤、
- (61)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (62)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 20 (63)上記(61)記載のスクリーニング方法または上記(62)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩、
- 25 (64)上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
 - (65)上記(41)~(47)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用い

ることを特徴とする上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 5 (66)上記(41)~(47)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 10 (67)上記(65)記載のスクリーニング方法または上記(66)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(33)記載の分泌蛋白質または上記(35)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、
- 15 (68) 上記 (33) 記載の分泌蛋白質または上記 (35) 記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (69) 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~234番目の 20 アミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特 徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (70)配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~234番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 25 (71)配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~21番目のアミノ酸配列、第26番目~58番目のアミノ酸配列、第60番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~107番目のアミノ酸配列、第110番目~187番目のアミノ酸配列または第190番目~234番目のアミノ酸配列と同ーもしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、

25

そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

- (72)配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~21番目のアミノ酸配列、第26番目~58番目のアミノ酸配列、第60番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~107番目のアミノ酸配列、第110番目~187番目のアミノ酸配列または第190番目~234番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (73)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチドの 部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (74)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチドの 10 前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (75)配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(74)記載の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (76)配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、その 15 アミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (77)上記(69)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
 - (78)配列番号:10で表わされる塩基配列の第43番目~702番目の塩 基配列からなる上記(77)記載のポリヌクレオチド、
- 20 (79) 上記 (71) 記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
 - (80)配列番号:10で表わされる塩基配列の第43番目~63番目の塩基配列、第76番目~174番目の塩基配列、第178番目~264番目の塩基配列、第268番目~321番目の塩基配列、第328番目~561番目の塩基配列または第568番目~702番目の塩基配列からなる上記(79)記載のポリヌクレオチド、
 - (81)上記(73)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含 有するポリヌクレオチド、
 - (82) 上記(74) 記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含

PCT/JP02/08872

10

有するポリヌクレオチド、

- (83)配列番号:10で表わされる塩基配列からなる上記(82)記載のポリヌクレオチド、
- (84)上記(77)~(83)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有 する組換えベクター、
 - (85)上記(84)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
 - (86)上記(85)記載の形質転換体を培養し、上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(69)記載の分泌蛋白質または
- 10 上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、
 - (87)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、
- 15 (88)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(87)記載の 抗体、
 - (89)上記(87)記載の抗体を含有してなる医薬、
- 20 (90)上記(87)記載の抗体を含有してなる診断薬、
 - (91)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩を含有してなる医薬、
- (92) 上記 (77) ~ (83) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有 25 してなる医薬、
 - (93)上記(77)~(83)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、
 - (94)上記(77)~(83)のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補 的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、

20

25

- (95)上記(94)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (96)上記(94)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤、
- 5 (97)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または 阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 - (98)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
 - (99)上記(97)記載のスクリーニング方法または上記(98)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩、
 - (100)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
 - (101)上記(77)~(83)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはそ

の塩のスクリーニング方法、

5

10

15

25

(102)上記(77)~(83)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(103)上記(101)記載のスクリーニング方法または上記(102)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(104)上記(69)記載の分泌蛋白質または上記(71)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(105)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~166番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(106)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~166番目 20 のアミノ酸配列をからなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまた はその塩、

(107)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~85番目のアミノ酸配列、第86番目~114番目のアミノ酸配列または第115番目~166番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(108)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~85番目のアミノ酸配列、第86番目~114番目のアミノ酸配列または第115番目~ 166番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩、

- (109)上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (110)上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - (111)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(110)記載の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (112)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そ 0アミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (113)上記(105)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを 含有するポリヌクレオチド、
 - (114)配列番号:11で表わされる塩基配列の第73番目~498番目の 塩基配列からなる上記(113)記載のポリヌクレオチド、
- 15 (115)上記(107)記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含 有するポリヌクレオチド、
 - (116)配列番号:11で表わされる塩基配列の第73番目~255番目の 塩基配列、第256番目~342番目または第343番目~498番目の塩基 配列からなる上記(115)記載のポリヌクレオチド、
- 20 (117)上記(109)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
 - (118)上記(110)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- (119)配列番号:11で表わされる塩基配列からなる上記(118)記載 25 のポリヌクレオチド、
 - (120)上記(113)~(119)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
 - (121)上記(120)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
 - (122) 上記 (121) 記載の形質転換体を培養し、上記 (105) 記載の

分泌蛋白質または上記(107)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

5 (123) 上記(105) 記載の分泌蛋白質または上記(107) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

(124)上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(123)記載の抗体、

(125) 上記(123) 記載の抗体を含有してなる医薬、

(126) 上記(123) 記載の抗体を含有してなる診断薬、

(127)上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプ 5 チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(128) 上記 (113) ~ (119) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(129) 上記 (113) ~ (119) のいずれかに記載のポリヌクレオチド 20 を含有してなる診断剤、

(130) 上記(113) \sim (119) のいずれかに記載のポリヌクレオチド と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、

(131)上記(130)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してな25 る医薬、

(132)上記(130)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

(133)上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは

そのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記 (105) 記載の分 泌蛋白質または上記(107)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその 前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を 促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- (134)上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプ 5 チド、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする上記(97) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミ ドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物また はその塩のスクリーニング用キット、
- 10 (135) 上記(133) 記載のスクリーニング方法または上記(134) 記 載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記 (105) 記載の分泌 蛋白質または上記(107)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前 駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促 進または阻害する化合物またはその塩、
- 15 (136)上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(107)記載のペプ チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を 含有してなる医薬、
- (137)上記(113)~(119)のいずれかに記載のポリヌクレオチド 20 を用いることを特徴とする上記(105)記載の分泌蛋白質または上記(10 7) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはその アミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物 またはその塩のスクリーニング方法、
- (138) 上記(113)~(119) のいずれかに記載のポリヌクレオチド 25 を含有することを特徴とする上記 (105) 記載の分泌蛋白質または上記 (1 07) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそ のアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合 物またはその塩のスクリーニング用キット、
 - (139) 上記(137) 記載のスクリーニング方法または上記(138) 記

載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(105)記載の分泌 蛋白質または上記(107)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前 駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促 進または阻害する化合物またはその塩、

- 5 (1.40) 上記(105) 記載の分泌蛋白質または上記(107) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (141)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~241番目 のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを 特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (142)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~241番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 15 (143)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~58番目のアミノ酸配列、第63番目~202番目のアミノ酸配列または第205番目~241番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 20 (144)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~58番目のアミノ酸配列、第63番目~202番目のアミノ酸配列または第205番目~241番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (145)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプ 25 チドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (146)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (147)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(146)記載の前駆体蛋

白質またはその塩、

- (148)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (149)上記(141)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを6有するポリヌクレオチド、
 - (150)配列番号:12で表わされる塩基配列の第55番目~723番目の 塩基配列からなる上記(149)記載のポリヌクレオチド、
 - (151)上記(143)記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- 10 (152) 配列番号:12で表わされる塩基配列の第55番目~174番目の 塩基配列、第187番目~606番目または第613番目~723番目の塩基 配列からなる上記(151) 記載のポリヌクレオチド、
 - (153)上記(145)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
- 15 (154)上記(146)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
 - (155)配列番号:12で表わされる塩基配列からなる上記(154)記載のポリヌクレオチド、
- (156)上記(149)~(155)のいずれかに記載のポリヌクレオチド20 を含有する組換えベクター、
 - (157)上記(156)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、(158)上記(157)記載の形質転換体を培養し、上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、
 - (159)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

(160)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(159)記載の抗体、

PCT/JP02/08872

- 5 (161) 上記 (159) 記載の抗体を含有してなる医薬、
 - (162)上記(159)記載の抗体を含有してなる診断薬、
 - (163)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、
- 10 (164)上記(149)~(155)のいずれかに記載のポリヌクレオチド を含有してなる医薬、
 - (165) 上記 (149) \sim (155) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、
- (166)上記(149)~(155)のいずれかに記載のポリヌクレオチド と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオ チド、
 - (167)上記(166)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (168) 上記(166) 記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してな 20 る診断剤、

25

- (169)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (170)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記(141)記載の

15

20

25

分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能 を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(171)上記(169)記載のスクリーニング方法または上記(170)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩、

(172)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプ 10 チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を 含有してなる医薬、

(173)上記(149)~(155)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(174)上記(149)~(155)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(175)上記(173)記載のスクリーニング方法または上記(174)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(176)上記(141)記載の分泌蛋白質または上記(143)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは

そのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を 含有してなる医薬、

(177) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~136番 目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列(例えば、配列 番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配 列、配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のア ミノ酸配列または配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~1 34番目のアミノ酸配列)を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミ ドもしくはそのエステルまたはその塩、

5

15

25

10 (178)配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~136番 目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまた はその塩、

(179)配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目~88番目 のアミノ酸配列、第80番目~88番目のアミノ酸配列、第91番目~133 番目のアミノ酸配列または第127番目~133番目のアミノ酸配列と同一も しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そ のアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(180) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目~88番目 のアミノ酸配列、第80番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~133 番目のアミノ酸配列、第91番目~133番目のアミノ酸配列、第93番目~ 20 133番目のアミノ酸配列、第104番目~133番目のアミノ酸配列、第1 08番目~133番目のアミノ酸配列、第109番目~133番目のアミノ酸 配列、第111番目~133番目のアミノ酸配列、第115番目~133番目 のアミノ酸配列、第119番目~1.33番目のアミノ酸配列、第124番目~ 133番目のアミノ酸配列、第126番目~133番目または第127番目~ 133番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩、

(181) 上記 (177) 記載の分泌蛋白質または上記 (179) 記載のペプ チドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

- (182)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (183)配列番号:23で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列(例えば、配列番号:27で表わされるアミノ酸配列、配列番号:38で表わされるアミノ酸配列または配列番号:42で表わされるアミノ酸配列)を含有することを特徴とする上記(182)記載の前駆体蛋白質またはその塩、
 - (184)配列番号:23で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、 そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 10 (185) 上記 (177) 記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを 含有するポリヌクレオチド、
 - (186) 配列番号: 24で表わされる塩基配列の第55番目~408番目の 塩基配列からなる上記(185) 記載のポリヌクレオチド、
- (187)上記(179)記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
 - (188)配列番号:24で表わされる塩基配列の第76番目~264番目の 塩基配列、第238番目~264番目、第271番目~399番目または第3 79番目~399番目の塩基配列からなる上記(187)記載のポリヌクレオ チド、
- 20 (189)上記(181)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
 - (190)上記(183)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
- (191)配列番号: 24で表わされる塩基配列からなる上記 (190) 記載 のポリヌクレオチド、
 - (192)上記(185)~(191)のいずれかに記載のポリヌクレオチド を含有する組換えベクター、
 - (193)上記(192)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
 - (194) 上記(193) 記載の形質転換体を培養し、上記(177) 記載の

分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

5 (195)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩に対する抗体、

(196)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(195)記載の抗体、

(197)上記(195)記載の抗体を含有してなる医薬、

(198)上記(195)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(199)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプ 5 チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(200)上記(185) \sim (191)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(201)上記(185)~(191)のいずれかに記載のポリヌクレオチド 20 を含有してなる診断剤、

(202)上記(185)~(191)のいずれかに記載のポリヌクレオチド と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオ チド、

(203)上記(202)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してな 25 る医薬、

(204)上記(202)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

(205)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

そのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(177)記載の分 泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその 前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を 促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

23

(206) 上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプ チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記(177)記載の 分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはそ の前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能 を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、 10

(207)上記(205)記載のスクリーニング方法または上記(206)記 載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(177)記載の分泌 蛋白質または上記 (179) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前 駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促 進または阻害する化合物またはその塩、

15

(208)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプ チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を 含有してなる医薬、

(209) 上記(185)~(191) のいずれかに記載のポリヌクレオチド 20 を用いることを特徴とする上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(17 9) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはその アミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物 またはその塩のスクリーニング方法、

(210) 上記(185)~(191) のいずれかに記載のポリヌクレオチド 25 を含有することを特徴とする上記 (177) 記載の分泌蛋白質または上記 (1 79) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそ のアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合 物またはその塩のスクリーニング用キット、

- (211)上記(209)記載のスクリーニング方法または上記(210)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、
- (212)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- 10 (213)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

15

- (214)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (215)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番目のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 20 (216)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番目のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (217)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 25 (218) 上記 (213) 記載の分泌蛋白質または上記 (215) 記載のペプ チドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (219)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(218)記載の前駆体蛋白質またはその塩、

- (220)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列からなる上記(219) 記載の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (221)上記(213)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを 含有するポリヌクレオチド、
- 5 (222)配列番号:28で表わされる塩基配列の第52番目~372番目の 塩基配列からなる上記(221)記載のポリヌクレオチド、
 - (223)上記(215)記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- (224)配列番号:28で表わされる塩基配列の第343番目~366番目 10 の塩基配列または第346番目~366番目の塩基配列からなる上記(223) 記載のポリヌクレオチド、
 - (225)上記(217)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
- (226)上記(219)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチド 15 を含有するポリヌクレオチド、
 - (227)配列番号: 28で表わされる塩基配列からなる上記(226)記載のポリヌクレオチド、
 - (228)上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- 20 (229)上記(228)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、(230)上記(229)記載の形質転換体を培養し、上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、
 - (231)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩に対する抗体、
 - (232) 上記 (213) 記載の分泌蛋白質または上記 (215) 記載のペプ

チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(231) 記載の抗体、

(233)上記(231)記載の抗体を含有してなる医薬、

5 (234)上記(231)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(235)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(236)上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレオチド 10 を含有してなる医薬、

(237) 上記 (221) \sim (227) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

(238)上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、

(239)上記(238)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(240)上記(238)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

20 (241)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(242)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはそ

10

15

20

25

の前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能 を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(243) 上記(241) 記載のスクリーニング方法または上記(242) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(213) 記載の分泌蛋白質または上記(215) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩、

(244)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(245)上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(246)上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(247)上記(245)記載のスクリーニング方法または上記(246)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(248)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を

10

15

20

25

含有してなる医薬、

(249) (i) 上記(177) 記載の分泌蛋白質または上記(179) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i) 上記(177) 記載の分泌蛋白質または上記(179) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(250)上記(249)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(251)上記(249)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(252) (i) 上記(177) 記載の分泌蛋白質または上記(179) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドも

10

15

20

25

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

しくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(253)上記(252)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(254)上記(252)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(255)(i)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)上記(213)記載の分泌

蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(256)上記(255)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

10

25

(257)上記(255)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:4 6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含 有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との 結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(258) (i) 上記(213) 記載の分泌蛋白質または上記(215) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i) 上記(213) 記載の分泌蛋白質または上記(215) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア

ミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(259)上記(258)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

10 (260)上記(258)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(261)該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその 塩を含有する細胞を用い、該細胞内 Ca^{2} +遊離または細胞内cAMP生成を指標とする上記(249)、(252)、(255)または(258)記載のスクリーニング方法、

(262)配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(263)配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番 25 目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまた はその塩、

(264) 配列番号: 38 で表わされるアミノ酸配列の第115番目 ~ 122 番目のアミノ酸配列または第116番目 ~ 122 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そ

- のアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (265) 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番目のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 5 (266)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (267)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (268) 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に 10 同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(267) 記載の前駆体 蛋白質またはその塩、
 - (269)配列番号:38で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、 そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (270)上記(262)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを 15 含有するポリヌクレオチド、
 - (271)配列番号:39で表わされる塩基配列の第52番目~372番目の 塩基配列からなる上記(270)記載のポリヌクレオチド、
 - (272)上記(264)記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- 20 (273)配列番号:39で表わされる塩基配列の第343番目~366番目 の塩基配列または第346番目~366番目の塩基配列からなる上記(272) 記載のポリヌクレオチド、
 - (274)上記(265)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- 25 (275)上記(267)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
 - (276)配列番号:39で表わされる塩基配列からなる上記(275)記載のポリヌクレオチド、
 - (277)上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチド

10

を含有する組換えベクター、

(278)上記(277)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、 (279)上記(278)記載の形質転換体を培養し、上記(262)記載の

分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

(280)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

(281)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(280)記載の抗体、

15 (282) 上記 (280) 記載の抗体を含有してなる医薬、

(283)上記(280)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(284)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

20 (285)上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチド を含有してなる医薬、

(286)上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

(287)上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチド 25 と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオ チド、

(288) 上記 (287) 記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(289) 上記(287) 記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してな

る診断剤、

5

10

15

25

(290)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(291)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(292)上記(290)記載のスクリーニング方法または上記(291)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩、

(293)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプ 20 チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を 含有してなる医薬、

(294)上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(295)上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(2

- 6 4) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (296)上記(294)記載のスクリーニング方法または上記(295)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、
- (297)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプ 10 チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を 含有してなる医薬、
 - (298)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~134番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (299)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~131番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (300)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第125番目~131 20 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (301) 配列番号: 42で表わされるアミノ酸配列の第125番目 \sim 131 番目のアミノ酸配列または第124番目 \sim 131番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 25 (302) 上記(298) 記載の分泌蛋白質または上記(300) 記載のペプ チドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (303)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 - (304)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 **36** .

同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(303)記載の前駆体 蛋白質またはその塩、

- (305)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、 そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (306)上記(298)記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを 含有するポリヌクレオチド、
 - (307)配列番号:43で表わされる塩基配列の第52番目~402番目の 塩基配列からなる上記(306)記載のポリヌクレオチド、
- (308) 上記(300) 記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含 10 有するポリヌクレオチド、
 - (309) 配列番号: 43で表わされる塩基配列の第373番目~393番目 の塩基配列または第370番目~393番目の塩基配列からなる上記(308) 記載のポリヌクレオチド、
- (310)上記(301)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド 15 を含有するポリヌクレオチド、
 - (311)上記(303)記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチド を含有するポリヌクレオチド、
 - (312) 配列番号: 43で表わされる塩基配列からなる上記(311) 記載 のポリヌクレオチド、
- (313) 上記(306)~(312) のいずれかに記載のポリヌクレオチド 20 を含有する組換えベクター、

25

- (314)上記(313)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- (315) 上記(314) 記載の形質転換体を培養し、上記(298) 記載の 分泌蛋白質または上記 (300) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはそ の前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記 (298) 記載の分泌蛋
- 白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆 体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、
- (316) 上記(298) 記載の分泌蛋白質または上記(300) 記載のペプ チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは

10

25

そのエステルまたはその塩に対する抗体、

- (317)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(316)記載の抗体、
- (318)上記(316)記載の抗体を含有してなる医薬、
- (319)上記(316)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (320)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、
- (321)上記(306) \sim (312)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (322)上記(306)~(312)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、
- 15 (323)上記(306)~(312)のいずれかに記載のポリヌクレオチド と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオ チド、
 - (324)上記(323)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- 20 (325)上記(323)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、
 - (326)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を
 - (327)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは

促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

そのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記 (298) 記載の 分泌蛋白質または上記 (300) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはそ の前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能 を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 5 (328)上記(326)記載のスクリーニング方法または上記(327)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩、
- 10 (329)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (330)上記(306)~(312)のいずれかに記載のポリヌクレオチド を用いることを特徴とする上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (331)上記(306)~(312)のいずれかに記載のポリヌクレオチド 20 を含有することを特徴とする上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (332)上記(330)記載のスクリーニング方法または上記(331)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

(333)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプ

15

20

25

チド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは そのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を 含有してなる医薬、

(334) (i)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(335)上記(334)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(336)上記(334)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

10

15

(337) (i)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(262)記載 のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドも しくはそのエステルまたはその塩と (ii) 配列番号:33または配列番号:3 5で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含 有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを 用いることを特徴とする、(i)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記 (264) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、また はそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と (ii) 配列番号:33また は配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア ミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドま たはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、 (338)上記(337)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるア ミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共 役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させ る化合物またはその塩、

(339)上記(337)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 20 上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるア ミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共 役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させ る化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(340) (i) 上記 (298) 記載の分泌蛋白質または上記 (300) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と (ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の

アミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

5

20

25

(341)上記(340)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:4 6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含 有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との 結合性を変化させる化合物またはその塩、

(342)上記(340)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(343)(i)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、また

25

はそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と (ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

5 (344)上記(343)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(345)上記(343)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)上記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(346)該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその
 塩を含有する細胞を用い、該細胞内Ca²⁺遊離または細胞内cAMP生成を指標とする上記(334)、(337)、(340)または(343)記載のスクリーニング方法、

(347)配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、

(348)配列番号: 44または配列番号: 46で表わされるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(349)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

- (350)配列番号: 45または配列番号: 47で表わされる塩基配列からなる上記(349)記載のポリヌクレオチド、
- (351)上記(349)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- (352)上記(351)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- 5 (353)上記(352)記載の形質転換体を培養し、上記(347)記載の G蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
 - (354)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- 10 (355)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記(354)記載の抗体、
 - (356)上記(354)記載の抗体を含有してなる医薬、
 - (357)上記(354)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- 15 (358)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、
 - (359)上記(349)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
 - (360)上記(349)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、
- (361)上記(349)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列または 20 その一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、
 - (362)上記(361)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
 - (363)上記(361)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、
- 25 (364)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 - (365)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分

25

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 44

ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする上記(347)記載のG蛋 白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進ま たは阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(366) 上記(364) 記載のスクリーニング方法または上記(365) 記 5 載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(347)記載のG蛋 白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進ま たは阻害する化合物またはその塩、

(367)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分 ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有 してなる医薬、

(368)上記(349)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする 上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドま たはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング 方法、

(369)上記(349)記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とす 15 る上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチド またはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニン グ用キット、

(370) 上記(368) 記載のスクリーニング方法または上記(369) 記 載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記 (347) 記載のG蛋 20 白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進ま たは阻害する化合物またはその塩、

(371)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその 部分ペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる 医薬、

(372)ホルモン分泌調節剤、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚 調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤である上 記(197)、(199)、(200)、(203, 208)、(212)、 (233), (235), (236), (239), (244), (248),

- (251)
 (254)
 (257)
 (282)
 (284)
 (288)

 (293)
 (297)
 (317)
 (320)
 (322)
 (324)
- (329), (333), (336), (342), (356), (359),
- (362)、(367)または(371)記載の医薬、
- 5 (373) プロラクチン分泌調節剤である上記(197)、(199)、(2
 - 00), (203), (208), (212), (233), (235), (2
 - 36), (239), (244), (248), (251), (257), (2
 - 82) 、 (284) 、 (285) 、 (288) 、 (293) 、 (297) 、 (3
 - 18), (320), (321), (324), (329), (333), (3
- 10 39) または(345) 記載の医薬、
 - (374) 哺乳動物に対して、
- (i) 上記(177) 記載の分泌蛋白質または上記(179) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 上記(185)~(191)のいずれかに記載の15 ポリヌクレオチド、(iii) 上記(195)記載の抗体、(iv) 上記(202)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(v) 上記(207)記載の化合物またはその塩、(vi) 上記(211)記載の化合物またはその塩、(vii) 上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたは20 その塩、(viii) 上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(ix) 上記(231)記載の抗体、(x) 上記(238)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi) 上記(243)記載の化合物またはその塩、(xiii) 上記(247)記載の化合物またはその塩、(xiii) 上記(247)記載の化合物またはその塩、(xiii) 上記(250)記
- 載の化合物またはその塩、(xiv)上記(256)記載の化合物またはその塩、(xv)上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xvi)上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xvii)上記(280)記載の抗体、(xviii)上記(287)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xix)上記(292)記載の化合

物またはその塩、(xx)上記(296)記載の化合物またはその塩、(xxi)上 記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部 分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステル またはその塩、(xxii)上記(306)~(312)のいずれかに記載のポリ 5 ヌクレオチド、 (xxiii) 上記 (316) 記載の抗体、 (xxiv) 上記 (323) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxv)上記(328)記載の化合物ま たはその塩、(xxvi)上記(332)記載の化合物またはその塩、(xxvii)上 記(335)記載の化合物またはその塩、(xxviii)上記(341)記載の化 合物またはその塩、(xxix)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター 蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、(xxxx)上記(349)記載のポリ 10 ヌクレオチド、 (xxxi) 上記 (354) 記載の抗体、 (xxxii) 上記 (361) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxxiii)上記(366)記載の化合 物、または(xxxiv)上記(370)記載の化合物の有効量を投与することを特 徴とするホルモン分泌調節、摂食、睡眠、覚醒、痛覚、ストレス応答、自発行 15 動または情動行動の調節方法、

(375) 哺乳動物に対して

20

25

(i) 上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 上記(185)~(191)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(iii) 上記(195)記載の抗体、(iv) 上記(202)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(v) 上記(207)記載の化合物またはその塩、(vi) 上記(211)記載の化合物またはその塩、(vii) 上記(213)記載の分泌蛋白質または上記(215)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(viii) 上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(ix) 上記(231)記載の抗体、(x) 上記(238)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi) 上記(243)記載の化合物またはその塩、(xiii) 上記(253)記載の化合物またはその塩、(xiii) 上記(253)記載の化合物またはその塩、(xiii) 上記(253)記載の化合物またはその塩、(xiii) 上記(253)記載の化合物またはその塩、(xiv) 上記(259)記載の化合物またはその塩、

10

15

- (xv) 上記(262) 記載の分泌蛋白質または上記(264) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xvi) 上記(270)~(276)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xvii) 上記(280) 記載の抗体、(xviii) 上記(287) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xix) 上記(292) 記載の化合物またはその塩、(xxi) 上記(296) 記載の化合物またはその塩、(xxi) 上記(298) 記載の分泌蛋白質または上記(300) 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xxii) 上記(306)~(312)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xxiii) 上記(316) 記載の抗体、(xxiv) 上記(323) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxv) 上記(328) 記載の化合物またはその塩、(xxvi) 上記(332) 記載の化合物またはその塩、(xxvii) 上記(338) 記載の化合物またはその塩、または(xxviii) 上記(344) 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするプロラクチン分泌調節方法、
 - (376) ホルモン分泌調節剤、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚 調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤を製造す るための
- (i) 上記(1 7 7)記載の分泌蛋白質または上記(1 7 9)記載のペプチド、20 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 上記(1 8 5)~(1 9 1)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(iii) 上記(1 9 5)記載の抗体、(iv) 上記(2 0 2)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(v) 上記(2 0 7)記載の化合物またはその塩、(vi) 上記(2 1 1)記載の化合物またはその塩、(vi) 上記(2 1 3)記載の分泌蛋白質または上記(2 1 5)記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(vii) 上記(2 2 1)~(2 2 7)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(ix) 上記(2 3 1)記載の抗体、(x) 上記(2 3 8)記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi) 上記(2 4 3)記載の化合物またはその塩、

(xii) 上記(247)記載の化合物またはその塩、(xiii)上記(250)記 載の化合物またはその塩、(xiv)上記(256)記載の化合物またはその塩、

(xv) 上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩、(xvi)上記(270)~(276)のいずれかに記載の ポリヌクレオチド、 (xvii) 上記 (280) 記載の抗体、 (xviii) 上記 (28 7) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xix) 上記(292) 記載の化合

5

10

20

物またはその塩、(xx)上記(296)記載の化合物またはその塩、(xxi)上 記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部

分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステル またはその塩、 (xxii) 上記 (306) ~ (312) のいずれかに記載のポリ ヌクレオチド、 (xxiii) 上記 (316) 記載の抗体、 (xxiv) 上記 (323) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxv)上記(328)記載の化合物ま たはその塩、(xxvi)上記(332)記載の化合物またはその塩、(xxvii)上

記(335)記載の化合物またはその塩、(xxviii)上記(341)記載の化 15 合物またはその塩、(xxix)上記(347)記載のG蛋白質共役型レセプター 蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、(xxxx)上記(349)記載のポリ ヌクレオチド、 (xxxi) 上記 (354) 記載の抗体、 (xxxii) 上記 (361) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxxiii)上記(366)記載の化合 物、または(xxxiv)上記(370)記載の化合物の使用、

(377) プロラクチン分泌調節剤を製造するための

(i) 上記(177)記載の分泌蛋白質または上記(179)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩、(ii)上記(185)~(191)のいずれかに記載の ポリヌクレオチド、(iii) 上記 (195) 記載の抗体、(iv) 上記 (202) 25 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(v)上記(207)記載の化合物また はその塩、(vi)上記(211)記載の化合物またはその塩、(vii)上記(2 13) 記載の分泌蛋白質または上記(215) 記載のペプチド、その部分ペプ チドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたは

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

その塩、(viii)上記(221)~(227)のいずれかに記載のポリヌクレ オチド、(ix)上記(231)記載の抗体、(x)上記(238)記載のアンチ センスポリヌクレオチド、(xi)上記(243)記載の化合物またはその塩、 (xii) 上記 (247) 記載の化合物またはその塩、 (xiii) 上記 (253) 記 載の化合物またはその塩、(xiv)上記(259)記載の化合物またはその塩、 (xv) 上記(262)記載の分泌蛋白質または上記(264)記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩、 (xvi) 上記 (270) ~ (276) のいずれかに記載の ポリヌクレオチド、(xvii)上記(280)記載の抗体、(xviii)上記(28 10 7) 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xix) 上記(292) 記載の化合 物またはその塩、(xx)上記(296)記載の化合物またはその塩、(xxi)上 記(298)記載の分泌蛋白質または上記(300)記載のペプチド、その部 分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステル またはその塩、 (xxii) 上記 (306) ~ (312) のいずれかに記載のポリ ヌクレオチド、 (xxiii) 上記 (316) 記載の抗体、 (xxiv) 上記 (323) 15 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxv)上記(328)記載の化合物ま ·たはその塩、(xxvi)上記(332)記載の化合物またはその塩、(xxvii)上 記(338)記載の化合物またはその塩、または(xxviii)上記(344)記 載の化合物またはその塩の使用、

- 20 (378)配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤、
- 25 (379)配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤、

10

15

20

(380)配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤、

(381)配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤、

(382)配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤、および(383)配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤を提供する。

図面の簡単な説明

- 図1は分泌蛋白質AのDNA配列を示す。
- 25 図2は分泌蛋白質Aのアミノ酸配列を示す。
 - 図3は分泌蛋白質BのDNA配列を示す。
 - 図4は分泌蛋白質Bのアミノ酸配列を示す。
 - 図5は分泌蛋白質CのDNA配列を示す。
 - 図6は分泌蛋白質Cのアミノ酸配列を示す。

- 図7は分泌蛋白質DのDNA配列を示す。
- 図8は分泌蛋白質Dのアミノ酸配列を示す。
- 図9は分泌蛋白質EのDNA配列を示す。
- 図10は分泌蛋白質Eのアミノ酸配列を示す。
- 5 図11は分泌蛋白質FのDNA配列を示す。
 - 図12は分泌蛋白質Fのアミノ酸配列を示す。
 - 図13は分泌蛋白質GのDNA配列を示す。
 - 図14は分泌蛋白質Gのアミノ酸配列を示す。
 - 図15は分泌蛋白質Fと分泌蛋白質Gのアミノ酸配列の比較図を示す。
- 10 図16は新規ポリペプチドF:Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号: 23の第127番目〜第133番目) および新規ポリペプチドF:

Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第80番目〜第88番目)のヒトAQ27受容体およびヒトOT7T022受容体を発現させていないHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性(ルシ

- フェラーゼ活性)を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性(cps)を示す。横軸はポリペプチドの濃度(μM)を示す。FSKはフォルスコリンを示す。EHAGCRFRF-NH2はポリペプチドGlu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH2(配列番号:23の第80番目~第88番目)を、GGFSFRFはポリペプチドGly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH2(配列番号:23の第127番目~第133番目)を示す。baseはポリペプチド無添加の場合を示す。
 - 図17は新規ポリペプチドF:Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH2(配列番号: 23の第127番目〜第133番目) および新規ポリペプチドF:

Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第80番目~第88番目)のヒトAQ27受容体を一過性に発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性(ルシフェラーゼ活性)を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性(cps)を示す。横軸はポリペプチドの濃度(μM)を示す。FSKはフォルスコリンを示す。EHAGCRFRF-NH₂はポリペプチドGlu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第80番目~第88番目)を、GGFSFRFはポリペプチド

Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号:23の第127番目~第133 番目)を示す。baseはポリペプチド無添加の場合を示す。

図18は新規ポリペプチドF:Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2(配列番号: 23の第127番目~第133番目) および新規ポリペプチドF:

- Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号:23の第80番目〜第 5 88番目)のヒトOT7T022受容体を一過性に発現させたHEK293細 胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性(ルシフェラーゼ活性)を示す。 縦軸はルシフェラーゼ活性 (c p s) を示す。横軸はポリペプチドの濃度 (μ M) を示す。FSKはフォルスコリンを示す。EHAGCRFRF-NH2はポリ
- 10 ペプチドGlu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH 2(配列番号:23の第8 O番目~第88番目)を、GGFSFRFはポリペプチド Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号: 23の第127番目~第133 番目)を示す。baseはポリペプチド無添加の場合を示す。
- 15 図20は分泌蛋白質Hのアミノ酸配列を示す。

図19は分泌蛋白質HのDNA配列を示す。

- 図21は新規ポリペプチドF:Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号: 23の第124番目~第133番目) のヒトAQ27受容体お よびヒトOT7T022受容体を発現させていないHEK293細胞に対する レポーター遺伝子発現量の上昇活性(ルシフェラーゼ活性)を示す。縦軸はル 20 シフェラーゼ活性 (c p s) を示す。横軸はポリペプチドの濃度 (μ M) を示 す。FSKはフォルスコリンを示す。RKKGGFSFRF-NH 。はポリペプチ ド Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2(配列番号:23の第12 4番目~第133番目)を示す。baseはポリペプチド無添加の場合を示す。 図 2 2 は新規ポリペプチドF:Arg-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-
- 25 NH 2 (配列番号: 2 3 の第 1 2 4 番目~第 1 3 3 番目) のヒトA Q 2 7 受容体を 発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性(ル シフェラーゼ活性)を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性(cps)を示す。横 軸はポリペプチドの濃度(μM)を示す。FSKはフォルスコリンを示す。R KKGGFSFRF-NH 2はポリペプチド

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 53

Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号:23の第124番 目~第133番目)を示す。baseはポリペプチド無添加の場合を示す。

図23は新規ポリペプチドF: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号:23の第124番目~第133番目) のヒトOT7T022受

5

10

25

容体を発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活 性(ルシフェラーゼ活性)を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性(cps)を示 す。横軸はポリペプチドの濃度(μM)を示す。FSKはフォルスコリンを示 す。RKKGGFSFRF-NH。はポリペプチド

Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号: 23の第124番 目~第133番目)を示す。baseはポリペプチド無添加の場合を示す。

図24はAQ27発現CHO細胞におけるcAMP産生抑制活性を示す。n= 2の平均値である。縦軸は c AMP 濃度 (pmol)を示す。横軸はポリペプチドの 濃度を1ogMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合 を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。RKKGGFSFRF-NH 。

はポリペプチドF: Arg-Lys-Cly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH2 (配列番 15 号:23の第124番目~第133番目)を示す。

図25はmock CHO細胞におけるcAMP産生抑制活性を示す。n=2の 平均値を示す。縦軸は c AMP 濃度(pmol)を示す。横軸はポリペプチドの濃度 をlogMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合を、

FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。RKKGGFSFRF-NH2はポ 20 リペプチドF: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号: 2 3の第124番目~第133番目)を示す。

図26はGGFSFRF-NH2のAQ27発現CHO細胞における細胞内カルシ ウムイオン遊離促進活性を示す。縦軸のF1uorescenceは蛍光強度 (cps)を示す。横軸は時間(秒)を示す。GGFSFRF-NH2はポリペプチドF: Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH (配列番号:23の第127番目~第133 番目)を示す。○、□および▲はそれぞれ添加したGGFSFRF-NH2の濃度 が $0 \mu M$ 、 $1 \mu M$ および $10 \mu M$ であることを示す。

図27はRKKGGFSFRF-NH,のAQ27発現CHO細胞における細胞内

図28は新規ポリペプチドF:

図29は新規ポリペプチドF:

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂,

- Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第108番目~第133番目および第91番目~第133番目)のヒトAQ27受容体を発現させていないHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性
- 15 (ルシフェラーゼ活性)を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性(cps)を示す。 横軸はポリペプチドの濃度を1 ogMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。 T1-F26-NH2は新規ポリペプチドF:

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg
Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH₂ (配列番号:23の第108番目~
第133番目)、Pyr1-F43-NH₂は新規ポリペプチドF:
Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH₂ (配列番号:23の第91番目~第133番目)を示す。Pyr は環状ピログルタミル化されたグルタミンを示す。

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂,

Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH,(配列番号:23の第108番目~ 第133番目および第91番目~第133番目)のヒトAQ27受容体を発現 させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性(ルシフ エラーゼ活性)を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性(cps)を示す。横軸は ポリペプチドの濃度をlogMで表したものである。FSK-はフォルスコリ ン無添加の場合を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。T1-F2 6-NH。は新規ポリペプチドF:

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-10 Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH。(配列番号:23の第108番目~ 第133番目、

Pyr1-F43-NH。は新規ポリペプチドF:

5

25

Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-

15 Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH, (配列番号:23の第91番目~第 133番目)を示す。Pyr は環状ピログルタミル化されたグルタミンを示す。 図30は新規ポリペプチドPyr 1-F43-NH 。による AQ27 発現 CHO 細胞で の細胞内カルシウムイオン動員活性を示す。縦軸のFluorescence は蛍光強度(cps)を示す。横軸は時間(秒)を示す。口はペプチド無添加の場合 を、■、△、▲、○、●および◇は添加したペプチドの濃度を1ogMで表し 20

たものであり、それぞれ5、6、7、8、9および10を示す。

図31はmock CHO細胞での細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する 新規ポリペプチドPyr 1-F43-NH₂の影響を調べた結果を示す。 縦軸のF luorescenceは蛍光強度(cps)を示す。横軸は時間(秒)を示 す。□はペプチド無添加の場合を、■、△、▲、○、●および◇は添加したペ プチドの濃度を1ogMで表したものであり、それぞれ5、6、7、8、9お よび10を示す。

図32は新規ポリペプチドPyr1-F43-NH2によるAQ27発現CHO細 胞でのcAMP産生抑制活性を示す。n=3の平均値。縦軸のinhibit

ionはcAMP産生抑制率(%)を示す。横軸のConc. は添加したペプ チドの濃度をlogMで表した。

図33はmock CHOのcAMP産生抑制活性に対する新規ポリペプチド Pyr 1 - F 4 3 - N H 2 の影響を調べた結果を示す。 n = 3 の平均値。縦軸の i nhibitionはcAMP産生抑制率(%)を示す。横軸のConc. は 添加したペプチドの濃度を10gMで表した。

図34は新規ポリペプチドF:

5

Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH2(配列番号:23の第61番目〜第 . 10 86番目)のヒトAQ27受容体を発現させていないHEK293細胞に対す るレポーター遺伝子発現量の上昇活性(ルシフェラーゼ活性)を示す。縦軸は ルシフェラーゼ活性(cps)、横軸はポリペプチドの濃度をlogMで表し たものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合を、FSK+はフォル スコリン添加の場合を示す。A1-F28-NH2は新規ポリペプチドF:

15 Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH。(配列番号:23の第61番目〜第 86番目)を示す。

図35は新規ポリペプチドF:

Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-20 Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH, (配列番号: 23の第61番目〜第 86番目)のヒトAQ27受容体を発現させたHEK293細胞に対するレポ ーター遺伝子発現量の上昇活性 (ルシフェラーゼ活性) を示す。縦軸のFlu orescenceはルシフェラーゼ活性(cps)、横軸はポリペプチドの 濃度を1ogMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合 を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。A1-F28-NH₂は新規 25 ポリペプチドF:

Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH, (配列番号: 23の第61番目〜第 86番目)を示す。

10

15

図36は新規ポリペプチドA1-F28-NH $_2$ によるAQ27発現CHO細胞での細胞内カルシウムイオン動員活性を示す。縦軸のFluorescenceは蛍光強度(cps)を示す。横軸は時間(秒)を示す。*はペプチド無添加の場合を、 \blacksquare 、 \blacksquare 、 \bigcirc 、 \bigcirc 、 \triangle 、 \bigcirc および \spadesuit はペプチドの濃度をlogMで表したものであり、それぞれ5、6、7、8、9および10を示す。

図37はmock CHO細胞での細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する新規ポリペプチドA $1-F28-NH_2$ の影響を調べた結果を示す。縦軸のF1uorescenceは蛍光強度(cps)を示す。横軸は時間(秒)を示す。*はペプチド無添加の場合を、 \blacksquare 、 \blacksquare 、 \bigcirc 、 \bigcirc 、 \blacktriangle 、 \diamondsuit および \spadesuit はペプチドの濃度を1ogMで表したものであり、それぞれ5、6、7、8、9および10を示す。

図38は新規ポリペプチドA1-F28-NH $_2$ によるAQ27発現CHO細胞でのcAMP産生抑制活性を示す。n=2の平均値。縦軸のinhibitionはcAMP産生抑制率(%)を示す。横軸のConc. は添加したペプチドの濃度を1ogMで表したものである。

図39はmock CHO細胞のcAMP産生抑制活性に対する新規ポリペプチドA1 $-F28-NH_2$ の影響を調べた結果を示す。n=2の平均値。縦軸のinhibitionは<math>cAMP産生抑制率(%)を示す。横軸のConc.は添加したペプチドの濃度をlogMで表したものである。

20 図40は分泌蛋白質IのDNA配列を示す。

図41は分泌蛋白質 I のアミノ酸配列を示す。

図42はラットAQ27受容体の塩基配列を示す。

図43はラットAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

図44はマウスAQ27受容体の塩基配列を示す。

25 図45はマウスAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

図46はヒトAQ27受容体(A)、ラットAQ27受容体(B) およびマウスAQ27受容体(C) のアミノ酸配列の相同性を示す。

図47はAQ27受容体mRNAのヒトにおける組織分布を示す。

図48はAQ27受容体mRNAのラットにおける組織分布を示す。図中の i

PCT/JP02/08872

はinfant(胎児)を示す。

図49は分泌蛋白質GのmRNAのラットにおける組織分布を示す。

図50は分泌蛋白質FのmRNAのヒトにおける組織分布を示す。

図51はin situハイブリダイゼーション法によるAQ27mRNAの 5 ラット脳における発現分布を示す。シグナルの相対強度の+++は最も強い(highest)、++は中程度(moderate density)、+ は弱い(low density)を示す。

図52は分泌蛋白質F遺伝子を導入したCHO細胞または分泌蛋白質F遺伝子 を導入していないCHO細胞の細胞上清をAQ27受容体発現細胞(AQ27

- /HEK) またはAQ27受容体を発現していない細胞(pAKKO/HEK) 10 に接触させた時の特異的刺激活性を検出した結果を示す。縦軸はルシフェラー ゼの発現量(cps)を示す。横軸はAQ27受容体に反応させた物質の濃度 または希釈度を示す。Basalは無添加の場合を示す。FSKはフォルスコ リンを添加した場合を示す。ペプチド(1)はペプチドF:
- 15 Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号:23の第80番目〜第 88番目)を、ペプチド(2)はポリペプチドF:

Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号:23の第127番目~第133 番目)を添加した場合を示す。mock SUP. は分泌蛋白質F遺伝子を導入 していないCHO細胞の細胞上清を添加した場合を示す。ペプチドF SUP.

- は分泌蛋白質F遺伝子を導入したCHO細胞の細胞上清を添加した場合を示す。 20 図53は既知の抗RFRPー1抗体 1F3-1と分泌蛋白質Fとの反応曲線 を示す。縦軸のB/B。(%) はサンプル添加時の結合量とサンプル非添加時の 結合量の比を、横軸のPeptide conc.は分泌蛋白質Fの濃度を1 ogMで表したものである。
- 図54は既知の抗RFRPー1抗体 1F3-1を用いたアフィニティクロマ 25 トグラフィー結合画分のAQ27受容体発現細胞(AQ27)またはAQ27 受容体を発現していない細胞 (pAKKO) に対する特異的刺激活性を示す。 横軸のLuciferase activityはルシフェラーゼ活性(cp s)を示す。横軸はアフィニティクロマトグラフィー結合画分の番号を示す。

図55は図54のフラクション20(fr. 20)を分離した時の各フラクションのAQ27受容体発現細胞に対する特異的刺激活性を示す。横軸のLuciferase activityはルシフェラーゼ活性(cps)を示す。横軸はフラクションの番号を示す。3と4は活性ピークを示す。

5 図56は図54のフラクション20-13(fr. 20-23)を分離した時の各フラクションのAQ27受容体発現細胞に対する特異的刺激活性を示す。 横軸のLuciferase activityはルシフェラーゼ活性(cps)を示す。横軸はフラクションの番号を示す。1と2は活性ピークを示す。 図57は図55および図56の活性ピーク1~4に含まれるペプチドFの測定 分子量と理論値およびアミノ酸配列を示す。

図 5 8 は長さの異なるペプチドFのアミノ酸配列と各種ペプチドFのAQ 2 7 発現CHO細胞株に対する c AMP産生抑制活性 (EC $_{50}$ 値)を示す。

図59は図58に示したペプチドFのAQ27発現CHO細胞株に対するcAMP産生抑制率を示す。縦軸のinhibition(%)はcAMP産生抑制率(%)を示す。横軸のConcentration(logM)は添加したペプチドFの濃度をlogMで表したものである。

発明を実施するための最良の形態

15

- (1)本発明の配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的 20 に同一のアミノ酸配列を有する分泌蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Aと略 記する場合がある)、
 - (2) 本発明の配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~112 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分泌 蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Bと略記する場合がある)、
- 25 (3)本発明の配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~234 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分泌 蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Cと略記する場合がある)、
 - (4) 本発明の配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~166 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分泌

蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Dと略記する場合がある)、

- (5) 本発明の配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~241 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分泌 蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Eと略記する場合がある)、
- 5 (6) 本発明の配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~13 6番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分 泌蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Fと略記する場合がある)、
 - (7) 本発明の配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分泌蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Gと略記する場合がある)、
 - (8) 本発明の配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~12 4番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分 泌蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質Hと略記する場合がある)または、
- (9) 本発明の配列番号: 42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~13 4番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する分 15 泌蛋白質(以下、本発明の分泌蛋白質 I と略記する場合がある)は、ヒトや温 血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、二ワトリ、ウサギ、ブタ、ヒ ツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細 胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス 細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪 20 細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細 胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨 細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、ま たはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など)もしくはそれらの細 胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃 25 核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下 垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、 筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臟、顎下腺、末 梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球

系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来するペプチドであってもよく、合成ペプチドであってもよい。

本願明細書において、アミノ酸配列Xとは、以下の9種類のアミノ酸配列から選ばれる1つのアミノ酸配列を示す。

- 10 (A) 配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列、
 - (B)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~112番目のアミノ酸配列、
 - (C)配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第15番目 ~ 234 番目のアミノ酸配列、
- 15 (D) 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~166番目のアミノ酸配列、
 - (E)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~241番目のアミノ酸配列、
- (F)配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~136番目の 20 アミノ酸配列、
 - (G)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列、
 - (H)配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列、
- 25 (I)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~134番目の アミノ酸配列。

アミノ酸配列Xと実質的に同一のアミノ酸配列Eとしては、アミノ酸配列Eと約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは約

95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。具体的には、配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~136番目のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列としては、配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列、配列番

5 号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列 または配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~134番目の アミノ酸配列が挙げられる。

アミノ酸配列Xと実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドとしては、 例えば、前記のアミノ酸配列Xと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、アミノ 酸配列Xを有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ま しい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のペプチドが有する活性(例えば、受容体との結合活性、受容体発現細胞に対する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 C a **遊離、細胞内 c AMP生成、細胞内 c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下、GTP y S 結合活性などを促進する活性等)、酵素活性、転写活性、結合タンパク質との結合活性等)などが挙げられる。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬 20 理学的に)同質であることを示す。

アミノ酸配列Xと同一または実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、(i)アミノ酸配列X、

- (ii) アミノ酸配列X中の1~30個(例えば1~10個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、より好ましくは1個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
 - (iii) アミノ酸配列Xに $1\sim30$ 個(例えば $1\sim10$ 個、好ましくは $1\sim5$ 個、 さらに好ましくは $1\sim3$ 個、より好ましくは1個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、
 - (iv) アミノ酸配列Xに1~30個(例えば1~10個、好ましくは1~5個、

さらに好ましくは $1 \sim 3$ 個、より好ましくは1 個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

- (v) アミノ酸配列X中の $1\sim30$ 個 $(例えば1\sim10$ 個、好ましくは $1\sim5$ 個、 さらに好ましくは $1\sim3$ 個、より好ましくは1個) のアミノ酸が他のアミノ酸 で置換されたアミノ酸配列、
- (vi)上記(ii)~(v)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。 本発明のペプチドの具体例としては、例えば、
- (1) 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなる分泌蛋白質A、
- (2)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~112番目のア 10 ミノ酸配列からなる分泌蛋白質B、
 - (3)配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~234番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質C、
 - (4)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~166番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質D、
- 15 (5)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~241番目のア ミノ酸配列からなる分泌蛋白質E、
 - (6)配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~136番目の アミノ酸配列からなる分泌蛋白質F、
- (7)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目の 20 アミノ酸配列からなる分泌蛋白質G、
 - (8)配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目の アミノ酸配列からなる分泌蛋白質H、
 - (9)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~134番目の アミノ酸配列からなる分泌蛋白質Iなどが挙げられる。
- 25 本願明細書において、上記の分泌蛋白質A、分泌蛋白質B、分泌蛋白質C、 分泌蛋白質D、分泌蛋白質E、分泌蛋白質F、分泌蛋白質G、分泌蛋白質Hお よび分泌蛋白質Iを本発明のペプチドと総称する場合がある。
 - (1) 本発明の配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~37番目のアミノ酸配列または第40番目~55番目のアミノ酸配列と同一もしくは

25

実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペプチドBと略記する場合がある)、

- (2) 本発明の配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~21番目のアミノ酸配列、第26番目~58番目のアミノ酸配列、第60番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~107番目のアミノ酸配列、第110番目~187番目のアミノ酸配列または第190番目~234番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペプチドCと略記する場合がある)、
- (3)本発明の配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~85番目のアミノ酸配列、第86番目~114番目のアミノ酸配列または第115番目~166番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペプチドDと略記する場合がある)、または(4)本発明の配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~58番目のアミノ酸配列、第63番目~202番目のアミノ酸配列または第205番目~241番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペプチドEと略記する場合がある)、
 - (5) 本発明の配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目~88番目のアミノ酸配列、第80番目~88番目のアミノ酸配列、第91番目~133番目のアミノ酸配列または第127番目~133番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペプチドアと略記する場合がある)、
 - (6) 本発明の配列番号: 27で表わされるアミノ酸配列の第115番目 ~1 22番目のアミノ酸配列または第116番目 ~122 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペプチドGと略記する場合がある)、
 - (7) 本発明の配列番号: 38で表わされるアミノ酸配列の第115番目 ~ 1 22番目のアミノ酸配列または第116番目 ~ 122 番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペプチドHと略記する場合がある)、

- (8) 本発明の配列番号: 42で表わされるアミノ酸配列の第124番目~1 31番目のアミノ酸配列または第125番目~131番目のアミノ酸配列と同 ーもしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本発明のペ プチドIと略記する場合がある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、 ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞 (例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、 骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内 皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロフ アージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基 10 球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨 細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹 細胞もしくは癌細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例 えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、 視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、 生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、 15 小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎 盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞 (例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-6 0, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-H 20 SB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来するペプチドであってもよく、合成ペプチドであってもよい。 本願明細書において、アミノ酸配列Yとは、以下の25種類のアミノ酸配列 から選ばれる1つのアミノ酸配列を示す。 25
 - (1) ①配列番号: 3 で表わされるアミノ酸配列の第22番目~37番目のアミノ酸配列、
 - ②配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第40番目~55番目のアミノ酸配列、

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 66

- (2) ①配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~21番目のア ミノ酸配列、
- ②配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第26番目~58番目のアミノ酸 配列、
- 5 ③配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第60番目~88番目のアミノ酸 配列、
 - ④配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第90番目~107番目のアミノ 酸配列、
- ⑤配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第110番目~187番目のアミ 10 ノ酸配列、
 - ⑥配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第190番目~234番目のアミ ノ酸配列、
 - (3) ①配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~85番目のア ミノ酸配列、
- ②配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第86番目~114番目のアミノ 15 酸配列、
 - ③配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第115番目~166番目のアミ ノ酸配列、
- (4) ①配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~58番目のア ミノ酸配列、 20
 - ②配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第63番目~202番目のアミノ 酸配列、
 - ③配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第205番目~241番目のアミ ノ酸配列、
- (5) ①配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目~88番目の 25 アミノ酸配列、
 - ②配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第80番目~88番目のアミノ 酸配列、
 - ③配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第91番目~133番目のアミ

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

ノ酸配列、

5

20

25

④配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第127番目~133番目のアミノ酸配列、

(6) ①配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番目のアミノ酸配列、

②配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第116番目~122番目のア ミノ酸配列、

- (7) ①配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番目のアミノ酸配列、
- 2配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第116番目~122番目のアミノ酸配列、
 - (8) ①配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第124番目~134番目のアミノ酸配列、

②配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第124番目~134番目のア 15 ミノ酸配列。

アミノ酸配列Yと実質的に同一のアミノ酸配列としては、アミノ酸配列Yと約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

アミノ酸配列Yと実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドとしては、 例えば、前記のアミノ酸配列Yと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、アミノ 酸配列Yを有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ま しい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のペプチドが有する活性(例えば、受容体との結合活性、受容体発現細胞に対する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 C a ²⁺遊離、細胞内 c AMP生成、細胞内 c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性等)、酵素活性、転写活性、結合タンパク質との結合活性等)などが挙げられる。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬 理学的に)同質であることを示す。

アミノ酸配列Yと同一または実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、

(i) アミノ酸配列Y、

10

15

25

- 5 (ii) アミノ酸配列Y中の $1\sim5$ 個(好ましくは $1\sim3$ 個、さらに好ましくは $1\sim2$ 個、より好ましくは1 個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
 - (iii) アミノ酸配列Yに $1\sim5$ 個(好ましくは $1\sim3$ 個、さらに好ましくは $1\sim2$ 個、より好ましくは1個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、
 - (iv)アミノ酸配列Yに $1\sim5$ 個(好ましくは $1\sim3$ 個、さらに好ましくは $1\sim2$ 個、より好ましくは1個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、
 - (v) アミノ酸配列Y中の $1\sim10$ 個(好ましくは $1\sim5$ 個、さらに好ましくは $1\sim3$ 個、より好ましくは1個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、
 - (vi) 上記(ii) ~ (v) を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。 本発明のペプチドの具体例としては、例えば、
 - (1)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~37番目のアミノ酸配列または第40番目~55番目のアミノ酸配列からなるペプチドB、
- (2)配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~21番目のアミノ酸配列、第26番目~58番目のアミノ酸配列、第60番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~107番目のアミノ酸配列、第110番目~187番目のアミノ酸配列または第190番目~234番目のアミノ酸配列からなるペプチドC、
 - (3) 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目 \sim 85番目のアミノ酸配列、第86番目 \sim 114番目のアミノ酸配列または第115番目 \sim 166番目のアミノ酸配列からなるペプチドD、
 - (4) 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目 ~ 58 番目のアミノ酸配列、第63番目 ~ 202 番目のアミノ酸配列または第205番目 ~ 241 番目のアミノ酸配列からなるペプチドE、
 - (5) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~88番目のア

15

20

25

ミノ酸配列、第20番目~88番目のアミノ酸配列、第21番目~88番目の アミノ酸配列、第22番目~88番目のアミノ酸配列、第23番目~88番目 のアミノ酸配列、第24番目~88番目のアミノ酸配列、第25番目~88番 目のアミノ酸配列、第26番目~88番目のアミノ酸配列、第27番目~88 番目のアミノ酸配列、第28番目~88番目のアミノ酸配列、第29番目~8 8番目のアミノ酸配列、第30番目~88番目のアミノ酸配列、第31番目~ 88番目のアミノ酸配列、第32番目~88番目のアミノ酸配列、第33番目 ~88番目のアミノ酸配列、第34番目~88番目のアミノ酸配列、第35番 目~88番目のアミノ酸配列、第36番目~88番目のアミノ酸配列、第37 番目~88番目のアミノ酸配列、第38番目~88番目のアミノ酸配列、第3 9番目~88番目のアミノ酸配列、第40番目~88番目のアミノ酸配列、第 41番目~88番目のアミノ酸配列、第42番目~88番目のアミノ酸配列、 第43番目~88番目のアミノ酸配列、第44番目~88番目のアミノ酸配列、 第45番目~88番目のアミノ酸配列、第46番目~88番目のアミノ酸配列、 第47番目~88番目のアミノ酸配列、第48番目~88番目のアミノ酸配列、 第49番目~88番目のアミノ酸配列、第50番目~88番目のアミノ酸配列、 第51番目~88番目のアミノ酸配列、第52番目~88番目のアミノ酸配列、 第53番目~88番目のアミノ酸配列、第54番目~88番目のアミノ酸配列、 第55番目~88番目のアミノ酸配列、第56番目~88番目のアミノ酸配列、 第57番目~88番目のアミノ酸配列、第58番目~88番目のアミノ酸配列、 第59番目~88番目のアミノ酸配列、第60番目~88番目のアミノ酸配列、 第61番目~88番目のアミノ酸配列、第62番目~88番目のアミノ酸配列、 第63番目~88番目のアミノ酸配列、第64番目~88番目のアミノ酸配列、 第65番目~88番目のアミノ酸配列、第66番目~88番目のアミノ酸配列、 第67番目~88番目のアミノ酸配列、第68番目~88番目のアミノ酸配列、 第69番目~88番目のアミノ酸配列、第70番目~88番目のアミノ酸配列、 第71番目~88番目のアミノ酸配列、第72番目~88番目のアミノ酸配列、 第73番目~88番目のアミノ酸配列、第74番目~88番目のアミノ酸配列、 第75番目~88番目のアミノ酸配列、第76番目~88番目のアミノ酸配列、

10

15

20

25

第77番目~88番目のアミノ酸配列、第78番目~88番目のアミノ酸配列、 第79番目~88番目のアミノ酸配列または第80番目~88番目のアミノ酸 配列からなるペプチドF、または配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の 第19番目~133番目のアミノ酸配列、第20番目~133番目のアミノ酸 配列、第21番目~133番目のアミノ酸配列、第22番目~133番目のア ミノ酸配列、第23番目~133番目のアミノ酸配列、第24番目~133番 目のアミノ酸配列、第25番目~133番目のアミノ酸配列、第26番目~1 33番目のアミノ酸配列、第27番目~133番目のアミノ酸配列、第28番 目~133番目のアミノ酸配列、第29番目~133番目のアミノ酸配列、第 30番目~133番目のアミノ酸配列、第31番目~133番目のアミノ酸配 列、第32番目~133番目のアミノ酸配列、第33番目~133番目のアミ ノ酸配列、第34番目~133番目のアミノ酸配列、第35番目~133番目 のアミノ酸配列、第36番目~133番目のアミノ酸配列、第37番目~13 3番目のアミノ酸配列、第38番目~133番目のアミノ酸配列、第39番目 ~133番目のアミノ酸配列、第40番目~133番目のアミノ酸配列、第4 1番目~133番目のアミノ酸配列、第42番目~133番目のアミノ酸配列、 第43番目~133番目のアミノ酸配列、第44番目~133番目のアミノ酸 配列、第45番目~133番目のアミノ酸配列、第46番目~133番目のア ミノ酸配列、第47番目~133番目のアミノ酸配列、第48番目~133番 目のアミノ酸配列、第49番目~133番目のアミノ酸配列、第50番目~1 33番目のアミノ酸配列、第51番目~133番目のアミノ酸配列、第52番 目~133番目のアミノ酸配列、第53番目~133番目のアミノ酸配列、第 54番目 \sim 133番目のアミノ酸配列、第55番目 \sim 133番目のアミノ酸配 列、第56番目~133番目のアミノ酸配列、第57番目~133番目のアミ ノ酸配列、第58番目~133番目のアミノ酸配列、第59番目~133番目 のアミノ酸配列、第60番目~133番目のアミノ酸配列、第61番目~13 3番目のアミノ酸配列、第62番目~133番目のアミノ酸配列、第63番目 ~133番目のアミノ酸配列、第64番目~133番目のアミノ酸配列、第6 5番目~133番目のアミノ酸配列、第66番目~133番目のアミノ酸配列、

15

20

25

第67番目~133番目のアミノ酸配列、第68番目~133番目のアミノ酸 配列、第69番目~133番目のアミノ酸配列、第70番目~133番目のア ミノ酸配列、第71番目~133番目のアミノ酸配列、第72番目~133番 目のアミノ酸配列、第73番目~133番目のアミノ酸配列、第74番目~1 33番目のアミノ酸配列、第75番目~133番目のアミノ酸配列、第76番 目~133番目のアミノ酸配列、第77番目~133番目のアミノ酸配列、第 78番目~133番目のアミノ酸配列、第79番目~133番目のアミノ酸配 列、第80番目~133番目のアミノ酸配列、第81番目~133番目のアミ ノ酸配列、第82番目~133番目のアミノ酸配列、第83番目~133番目 のアミノ酸配列、第84番目~133番目のアミノ酸配列、第85番目~13 3番目のアミノ酸配列、第86番目~133番目のアミノ酸配列、第87番目 ~133番目のアミノ酸配列、第88番目~133番目のアミノ酸配列、第8 9番目~133番目のアミノ酸配列、第90番目~133番目のアミノ酸配列、 第91番目~133番目のアミノ酸配列、第92番目~133番目のアミノ酸 配列、第93番目~133番目のアミノ酸配列、第94番目~133番目のア ミノ酸配列、第95番目~133番目のアミノ酸配列、第96番目~133番 目のアミノ酸配列、第97番目~133番目のアミノ酸配列、第98番目~1 33番目のアミノ酸配列、第99番目~133番目のアミノ酸配列、第100 番目~133番目のアミノ酸配列、第101番目~133番目のアミノ酸配列、 第102番目~133番目のアミノ酸配列、第103番目~133番目のアミ ノ酸配列、第104番目~133番目のアミノ酸配列、第105番目~133 番目のアミノ酸配列、第106番目~133番目のアミノ酸配列、第107番 目~133番目のアミノ酸配列、第108番目~133番目のアミノ酸配列、 第109番目~133番目のアミノ酸配列、第110番目~133番目のアミ ノ酸配列、第111番目~133番目のアミノ酸配列、第112番目~133 番目のアミノ酸配列、第113番目~133番目のアミノ酸配列、第114番 目~133番目のアミノ酸配列、第115番目~133番目のアミノ酸配列、 第116番目~133番目のアミノ酸配列、第117番目~133番目のアミ ノ酸配列、第118番目~133番目のアミノ酸配列、第119番目~133

番目のアミノ酸配列、第120番目~133番目のアミノ酸配列、第121番 目~133番目のアミノ酸配列、第122番目~133番目のアミノ酸配列、 第123番目~133番目のアミノ酸配列、第124番目~133番目のアミ ノ酸配列、第125番目~133番目のアミノ酸配列、第126番目~133 番目のアミノ酸配列または第127番目~133番目のアミノ酸配列からなる ペプチドF(なかでも配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目 ~88番目のアミノ酸配列、第80番目~88番目のアミノ酸配列、第90番 目~133番目のアミノ酸配列、第91番目~133番目のアミノ酸配列、第 93番目~133番目のアミノ酸配列、第104番目~133番目のアミノ酸 配列、第108番目~133番目のアミノ酸配列、第109番目~133番目 10 のアミノ酸配列、第111番目~133番目のアミノ酸配列、第115番目~ 133番目のアミノ酸配列、第119番目~133番目のアミノ酸配列、第1 24番目~133番目のアミノ酸配列、第126番目~133番目、第127 番目~133番目のアミノ酸配列からなるペプチドFなどが好ましく、特に第 90番目~133番目のアミノ酸配列、第91番目~133番目のアミノ酸配 列、第93番目~133番目のアミノ酸配列、第104番目~133番目のア ミノ酸配列、第108番目~133番目のアミノ酸配列、第109番目~13 3番目のアミノ酸配列、第111番目~133番目のアミノ酸配列、第115 番目~133番目のアミノ酸配列、第119番目~133番目のアミノ酸配列、 第124番目~133番目のアミノ酸配列、第126番目~133番目、第1 27番目~133番目のアミノ酸配列からなるペプチドFなどが好ましく、第 91番目~133番目のアミノ酸配列からなるペプチドFはN末端のグルタミ ン残基がピログルタミン化されていてもよく、第90番目~133番目のアミ ノ酸配列からなるペプチドFはN末端のグルタミン残基がTyrに置換されて いてもよい(図57および図58参照))、

15

20

25

(6) 配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~122番目の アミノ酸配列、第19番目~122番目のアミノ酸配列、第20番目~122 番目のアミノ酸配列、第21番目~122番目のアミノ酸配列、第22番目~ 122番目のアミノ酸配列、第23番目~122番目のアミノ酸配列、第24

番目~122番目のアミノ酸配列、第25番目~122番目のアミノ酸配列、 第26番目~122番目のアミノ酸配列、第27番目~122番目のアミノ酸 配列、第28番目~122番目のアミノ酸配列、第29番目~122番目のア ミノ酸配列、第30番目~122番目のアミノ酸配列、第31番目~122番 目のアミノ酸配列、第32番目~122番目のアミノ酸配列、第33番目~1 22番目のアミノ酸配列、第34番目~122番目のアミノ酸配列、第35番 目~122番目のアミノ酸配列、第36番目~122番目のアミノ酸配列、第 37番目~122番目のアミノ酸配列、第38番目~122番目のアミノ酸配 列、第39番目~122番目のアミノ酸配列、第40番目~122番目のアミ ノ酸配列、第41番目~122番目のアミノ酸配列、第42番目~122番目 のアミノ酸配列、第43番目~122番目のアミノ酸配列、第44番目~12 2番目のアミノ酸配列、第45番目~122番目のアミノ酸配列、第46番目 ~122番目のアミノ酸配列、第47番目~122番目のアミノ酸配列、第4 8番目~122番目のアミノ酸配列、第49番目~122番目のアミノ酸配列、 第50番目~122番目のアミノ酸配列、第51番目~122番目のアミノ酸 配列、第52番目~122番目のアミノ酸配列、第53番目~122番目のア ミノ酸配列、第54番目~122番目のアミノ酸配列、第55番目~122番 目のアミノ酸配列、第56番目~122番目のアミノ酸配列、第57番目~1 22番目のアミノ酸配列、第58番目~122番目のアミノ酸配列、第59番 目~122番目のアミノ酸配列、第60番目~122番目のアミノ酸配列、第 61番目~122番目のアミノ酸配列、第62番目~122番目のアミノ酸配 列、第63番目~122番目のアミノ酸配列、第64番目~122番目のアミ ノ酸配列、第65番目~122番目のアミノ酸配列、第66番目~122番目 のアミノ酸配列、第67番目~122番目のアミノ酸配列、第68番目~12 2番目のアミノ酸配列、第69番目~122番目のアミノ酸配列、第70番目 ~122番目のアミノ酸配列、第71番目~122番目のアミノ酸配列、第7 2番目~122番目のアミノ酸配列、第73番目~122番目のアミノ酸配列、 第74番目~122番目のアミノ酸配列、第75番目~122番目のアミノ酸 配列、第76番目~122番目のアミノ酸配列、第77番目~122番目のア

10

15

20

25

10

15

20

25

ミノ酸配列、第78番目~122番目のアミノ酸配列、第79番目~122番 目のアミノ酸配列、第80番目~122番目のアミノ酸配列、第81番目~1 22番目のアミノ酸配列、第82番目~122番目のアミノ酸配列、第83番 目~122番目のアミノ酸配列、第84番目~122番目のアミノ酸配列、第 85番目~122番目のアミノ酸配列、第86番目~122番目のアミノ酸配 列、第87番目~122番目のアミノ酸配列、第88番目~122番目のアミ ノ酸配列、第89番目~122番目のアミノ酸配列、第90番目~122番目 のアミノ酸配列、第91番目~122番目のアミノ酸配列、第92番目~12 2番目のアミノ酸配列、第93番目~122番目のアミノ酸配列、第94番目 ~122番目のアミノ酸配列、第95番目~122番目のアミノ酸配列、第9 6番目~122番目のアミノ酸配列、第97番目~122番目のアミノ酸配列、 第98番目~122番目のアミノ酸配列、第99番目~122番目のアミノ酸 配列、第100番目~122番目のアミノ酸配列、第101番目~122番目 のアミノ酸配列、第102番目~122番目のアミノ酸配列、第103番目~ 122番目のアミノ酸配列、第104番目~122番目のアミノ酸配列、第1 05番目~122番目のアミノ酸配列、第106番目~122番目のアミノ酸 配列、第107番目~122番目のアミノ酸配列、第108番目~122番目 のアミノ酸配列、第109番目~122番目のアミノ酸配列、第110番目~ 122番目のアミノ酸配列、第111番目~122番目のアミノ酸配列、第1 12番目~122番目のアミノ酸配列、第113番目~122番目のアミノ酸 配列、第114番目~122番目のアミノ酸配列、第115番目~122番目 のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列からなるペプ チドG(なかでも配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第115番目~ 122番目のアミノ酸配列、第116番目~122番目のアミノ酸配列からな るペプチドGなどが好ましい)、

(7)配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~122番目のアミノ酸配列、第19番目~122番目のアミノ酸配列、第20番目~122番目のアミノ酸配列、第22番目~122番目のアミノ酸配列、第22番目~122番目のアミノ酸配列、第24

15

20

25

PCT/JP02/08872 WO 03/020932

番目~122番目のアミノ酸配列、第25番目~122番目のアミノ酸配列、 第26番目~122番目のアミノ酸配列、第27番目~122番目のアミノ酸 配列、第28番目~122番目のアミノ酸配列、第29番目~122番目のア ミノ酸配列、第30番目~122番目のアミノ酸配列、第31番目~122番 目のアミノ酸配列、第32番目~122番目のアミノ酸配列、第33番目~1 22番目のアミノ酸配列、第34番目~122番目のアミノ酸配列、第35番 目~122番目のアミノ酸配列、第36番目~122番目のアミノ酸配列、第 37番目~122番目のアミノ酸配列、第38番目~122番目のアミノ酸配 列、第39番目~122番目のアミノ酸配列、第40番目~122番目のアミ ノ酸配列、第41番目~122番目のアミノ酸配列、第42番目~122番目 のアミノ酸配列、第43番目~122番目のアミノ酸配列、第44番目~12 2番目のアミノ酸配列、第45番目~122番目のアミノ酸配列、第46番目 ~122番目のアミノ酸配列、第47番目~122番目のアミノ酸配列、第4 8番目~122番目のアミノ酸配列、第49番目~122番目のアミノ酸配列、 第50番目~122番目のアミノ酸配列、第51番目~122番目のアミノ酸 配列、第52番目~122番目のアミノ酸配列、第53番目~122番目のア ミノ酸配列、第54番目~122番目のアミノ酸配列、第55番目~122番 目のアミノ酸配列、第56番目~122番目のアミノ酸配列、第57番目~1 22番目のアミノ酸配列、第58番目~122番目のアミノ酸配列、第59番 目~122番目のアミノ酸配列、第60番目~122番目のアミノ酸配列、第 61番目~122番目のアミノ酸配列、第62番目~122番目のアミノ酸配 列、第63番目~122番目のアミノ酸配列、第64番目~122番目のアミ ノ酸配列、第65番目~122番目のアミノ酸配列、第66番目~122番目 のアミノ酸配列、第67番目~122番目のアミノ酸配列、第68番目~12 2番目のアミノ酸配列、第69番目~122番目のアミノ酸配列、第70番目 ~122番目のアミノ酸配列、第71番目~122番目のアミノ酸配列、第7 2番目~122番目のアミノ酸配列、第73番目~122番目のアミノ酸配列、 第74番目~122番目のアミノ酸配列、第75番目~122番目のアミノ酸 配列、第76番目~122番目のアミノ酸配列、第77番目~122番目のア

10

15

20

25

ミノ酸配列、第78番目~122番目のアミノ酸配列、第79番目~122番 目のアミノ酸配列、第80番目~122番目のアミノ酸配列、第81番目~1 22番目のアミノ酸配列、第82番目~122番目のアミノ酸配列、第83番 目~122番目のアミノ酸配列、第84番目~122番目のアミノ酸配列、第 85番目~122番目のアミノ酸配列、第86番目~122番目のアミノ酸配 列、第87番目~122番目のアミノ酸配列、第88番目~122番目のアミ ノ酸配列、第89番目~122番目のアミノ酸配列、第90番目~122番目 のアミノ酸配列、第91番目~122番目のアミノ酸配列、第92番目~12 2番目のアミノ酸配列、第93番目~122番目のアミノ酸配列、第94番目 ~122番目のアミノ酸配列、第95番目~122番目のアミノ酸配列、第9 6番目~122番目のアミノ酸配列、第97番目~122番目のアミノ酸配列、 第98番目~122番目のアミノ酸配列、第99番目~122番目のアミノ酸 配列、第100番目~122番目のアミノ酸配列、第101番目~122番目 のアミノ酸配列、第102番目~122番目のアミノ酸配列、第103番目~ 122番目のアミノ酸配列、第104番目~122番目のアミノ酸配列、第1 05番目~122番目のアミノ酸配列、第106番目~122番目のアミノ酸 配列、第107番目~122番目のアミノ酸配列、第108番目~122番目 のアミノ酸配列、第109番目~122番目のアミノ酸配列、第110番目~ 122番目のアミノ酸配列、第111番目~122番目のアミノ酸配列、第1 12番目~122番目のアミノ酸配列、第113番目~122番目のアミノ酸 配列、第114番目~122番目のアミノ酸配列、第115番目~122番目 のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列からなるペプ チドH(なかでも配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第115番目~ 122番目のアミノ酸配列、第116番目~122番目のアミノ酸配列からな るペプチドHなどが好ましい)、

(8) 配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~131番目の アミノ酸配列、第19番目~131番目のアミノ酸配列、第20番目~131 番目のアミノ酸配列、第21番目~131番目のアミノ酸配列、第22番目~ 131番目のアミノ酸配列、第23番目~131番目のアミノ酸配列、第24

番目~131番目のアミノ酸配列、第25番目~131番目のアミノ酸配列、 第26番目~131番目のアミノ酸配列、第27番目~131番目のアミノ酸 配列、第28番目~131番目のアミノ酸配列、第29番目~131番目のア ミノ酸配列、第30番目~131番目のアミノ酸配列、第31番目~131番 目のアミノ酸配列、第32番目~131番目のアミノ酸配列、第33番目~1 31番目のアミノ酸配列、第34番目~131番目のアミノ酸配列、第35番 目~131番目のアミノ酸配列、第36番目~131番目のアミノ酸配列、第 37番目~131番目のアミノ酸配列、第38番目~131番目のアミノ酸配 列、第39番目~131番目のアミノ酸配列、第40番目~131番目のアミ ノ酸配列、第41番目~131番目のアミノ酸配列、第42番目~131番目 のアミノ酸配列、第43番目~131番目のアミノ酸配列、第44番目~13 1番目のアミノ酸配列、第45番目~131番目のアミノ酸配列、第46番目 ~131番目のアミノ酸配列、第47番目~131番目のアミノ酸配列、第4 8番目~131番目のアミノ酸配列、第49番目~131番目のアミノ酸配列、 第50番目~131番目のアミノ酸配列、第51番目~131番目のアミノ酸 配列、第52番目~131番目のアミノ酸配列、第53番目~131番目のア ミノ酸配列、第54番目~131番目のアミノ酸配列、第55番目~131番 目のアミノ酸配列、第56番目~131番目のアミノ酸配列、第57番目~1 31番目のアミノ酸配列、第58番目~131番目のアミノ酸配列、第59番 目~131番目のアミノ酸配列、第60番目~131番目のアミノ酸配列、第 61番目~131番目のアミノ酸配列、第62番目~131番目のアミノ酸配 列、第63番目~131番目のアミノ酸配列、第64番目~131番目のアミ ノ酸配列、第65番目~131番目のアミノ酸配列、第66番目~131番目 のアミノ酸配列、第67番目~131番目のアミノ酸配列、第68番目~13 1番目のアミノ酸配列、第69番目~131番目のアミノ酸配列、第70番目 ~131番目のアミノ酸配列、第71番目~131番目のアミノ酸配列、第7 2番目~131番目のアミノ酸配列、第73番目~131番目のアミノ酸配列、 第74番目~131番目のアミノ酸配列、第75番目~131番目のアミノ酸 配列、第76番目~131番目のアミノ酸配列、第77番目~131番目のア

10

15

20

25

ミノ酸配列、第78番目~131番目のアミノ酸配列、第79番目~131番 目のアミノ酸配列、第80番目~131番目のアミノ酸配列、第81番目~1 31番目のアミノ酸配列、第82番目~131番目のアミノ酸配列、第83番 目~131番目のアミノ酸配列、第84番目~131番目のアミノ酸配列、第 85番目~131番目のアミノ酸配列、第86番目~131番目のアミノ酸配 5 列、第87番目~131番目のアミノ酸配列、第88番目~131番目のアミ ノ酸配列、第89番目~131番目のアミノ酸配列、第90番目~131番目 のアミノ酸配列、第91番目~131番目のアミノ酸配列、第92番目~13 1番目のアミノ酸配列、第93番目~131番目のアミノ酸配列、第94番目 10 ~131番目のアミノ酸配列、第95番目~131番目のアミノ酸配列、第9 6番目~131番目のアミノ酸配列、第97番目~131番目のアミノ酸配列、 第98番目~131番目のアミノ酸配列、第99番目~131番目のアミノ酸 配列、第100番目~131番目のアミノ酸配列、第101番目~131番目 のアミノ酸配列、第102番目~131番目のアミノ酸配列、第103番目~ 15 131番目のアミノ酸配列、第104番目~131番目のアミノ酸配列、第1 05番目~131番目のアミノ酸配列、第106番目~131番目のアミノ酸 配列、第107番目~131番目のアミノ酸配列、第108番目~131番目 のアミノ酸配列、第109番目~131番目のアミノ酸配列、第110番目~ 131番目のアミノ酸配列、第111番目~131番目のアミノ酸配列、第1 12番目~131番目のアミノ酸配列、第113番目~131番目のアミノ酸 20 配列、第114番目~131番目のアミノ酸配列、第115番目~131番目 のアミノ酸配列、第116番目~131番目のアミノ酸配列、第117番目~ 131番目のアミノ酸配列、第118番目~131番目のアミノ酸配列、第1 19番目~131番目のアミノ酸配列、第120番目~131番目のアミノ酸 配列、第121番目~131番目のアミノ酸配列、第122番目~131番目 のアミノ酸配列、第123番目~131番目のアミノ酸配列、第124番目~ 131番目のアミノ酸配列または第125番目~131番目のアミノ酸配列か らなるペプチドI (なかでも配列番号: 42で表わされるアミノ酸配列の第1 24番目~131番目のアミノ酸配列、第125番目~131番目のアミノ酸

25

配列からなるペプチドIなどが好ましい)などが挙げられる。

これらのペプチドとしては、C末端のアミド体が好ましく用いられる。

本願明細書において、上記のペプチドB、ペプチドC、ペプチドD、ペプチドE、ペプチドF、ペプチドG、ペプチドHおよびペプチドIを本発明のペプチドと総称する場合がある。

本発明の部分ペプチドとしては、前記した本発明のペプチドの部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、通常、アミノ酸が5個以上、好ましくは10個以上からなるペプチドが好ましく、さらには、本発明のペプチドと同様の活性を有するものが好ましい。

10 本発明の分泌蛋白質または本発明のペプチドの前駆体蛋白質としては、前記した本発明の分泌蛋白質または本発明のペプチドを含む蛋白質であり、適当なペプチダーゼ等で切断することによって、本発明の分泌蛋白質または本発明のペプチドを製造し得るものである。

具体的には、

- 15 (1)分泌蛋白質Aの前駆体蛋白質としては、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する前駆体蛋白質Aなどが、
 - (2)分泌蛋白質BまたはペプチドBの前駆体蛋白質としては、配列番号:3 で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Bなどが、
- 20 (3)分泌蛋白質CまたはペプチドCの前駆体蛋白質としては、配列番号: 4 で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Cなどが、
 - (4)分泌蛋白質DまたはペプチドDの前駆体蛋白質としては、配列番号:5 で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Dなどが、
- (5)分泌蛋白質EまたはペプチドEの前駆体蛋白質としては、配列番号:625 で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Eなどが、
 - (6) 分泌蛋白質FまたはペプチドFの前駆体蛋白質としては、配列番号:23で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Fなどが、
 - (7)分泌蛋白質GまたはペプチドGの前駆体蛋白質としては、配列番号:27で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Gなどが、

(8) 分泌蛋白質HまたはペプチドHの前駆体蛋白質としては、配列番号:3 8で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Hなどが、

PCT/JP02/08872

- (9) 分泌蛋白質 I またはペプチド I の前駆体蛋白質としては、配列番号: 4 2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質 I などが用いられる。
- 5 本願明細書において、アミノ酸配列 Z とは、配列番号: 2~配列番号: 6、 配列番号: 23、配列番号: 27、配列番号: 38および配列番号: 42から 選ばれる1つの配列番号で表されるアミノ酸配列を示す。

アミノ酸配列スと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質 は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサ ギ、プタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、網膜細胞、肝細胞、脾 10 細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ラ ンゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、 筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュ ラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑 膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは 15 間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など)もしく はそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位 (例、網膜、 嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、 脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、 皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下 20 腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、また は血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL -1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HU 25 T-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など) に由来する蛋白質であってもよく、 合成蛋白質であってもよい。

アミノ酸配列2と実質的に同一のアミノ酸配列としては、アミノ酸配列2と

約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。具体的には、配列番号:23で表わされるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列としては、配列番号:27で表わされるアミノ酸配列、配列番号:38で表わされるアミノ酸配列または配列番号:42で表わされるアミノ酸配列が挙げられる。

特に、アミノ酸配列スと実質的に同一のアミノ酸配列としては、

- (i) アミノ酸配列2、
- 10 (ii) アミノ酸配列 Z 中の $1 \sim 30$ 個(例えば $1 \sim 15$ 個、好ましくは $1 \sim 10$ の個、さらに好ましくは $1 \sim 5$ 個、より好ましくは $1 \sim 3$ 個、特に好ましくは $1 \sim 10$ のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
 - (iii) アミノ酸配列Zに $1\sim30$ 個(例えば $1\sim15$ 個、好ましくは $1\sim10$ 個、さらに好ましくは $1\sim5$ 個、より好ましくは $1\sim3$ 個、特に好ましくは1
- 15 個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、
 - (iv) アミノ酸配列Zに $1\sim30$ 個(例えば $1\sim15$ 個、好ましくは $1\sim10$ 個、さらに好ましくは $1\sim5$ 個、より好ましくは $1\sim3$ 個、特に好ましくは1個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、
- (v) アミノ酸配列 Z 中の $1\sim30$ 個(例えば $1\sim15$ 個、好ましくは $1\sim10$ 20 個、さらに好ましくは $1\sim5$ 個、より好ましくは $1\sim3$ 個、特に好ましくは 1 個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、
 - (vi)上記(ii)~(v)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。 本発明の前駆体蛋白質の具体例としては、例えば、
 - (1) 配列番号:2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質A、
- 25 (2)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質B、
 - (3) 配列番号: 4 で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質 C、
 - (4) 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質D、
 - (5) 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質E、
 - (6) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質F、

- (7) 配列番号:27で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質G、
- (8) 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質H、
- (9) 配列番号: 42で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質 I などが挙げられる。
- 5 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなる分泌蛋白質Aは、配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Aから分泌シグナル配列を 除いたものである。

配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第1番目~21番目のアミノ酸配列は分泌シグナル配列を示す

10 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第1番目~14番目のアミノ酸配列は分泌シグナル配列を示す。

配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第1番目~24番目のアミノ酸配列は分泌シグナル配列を示す。

配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第1番目~18番目のアミノ酸配 15 列は分泌シグナル配列を示す。

配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第1番目~18番目のアミノ酸 配列は分泌シグナル配列を示す。

配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第1番目~17番目のアミノ酸 配列は分泌シグナル配列を示す。

20 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第1番目~17番目のアミノ酸 配列は分泌シグナル配列を示す。

配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第1番目~17番目のアミノ酸配列は分泌シグナル配列を示す。

本発明の前駆体蛋白質は、本発明の分泌蛋白質または本発明のペプチドと同様の活性を有していてもよい。

本発明の分泌蛋白質または本発明のペプチド、その部分ペプチドまたはその 前駆体蛋白質(以下、本発明のペプチドと略記する場合がある)は、ペプチド 標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシ ル末端)である。

20

配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなるペプチドをはじめとする、本発明のペプチドは、C末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COOT)であるが、C末端がアミド($-CONH_2$)またはエステル(-COOR)であってもよい。

5 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくは $n-プチルなどのC_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α ーナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニルー C_{1-2} アルキル基もしくは α ーナフチルメチルなどの α ーナフチルー C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のペプチドには、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

25 本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、

クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン 酸)との塩などが用いられる。以下、塩も含めて、本発明のペプチドと称する。

本発明のペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公 知のペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するペプチド をコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製 造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもで きる。

5

10

15

20

25

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織 または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相ク ロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー を組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のペプチドまたはそれらのアミド体の合成には、通常市販のペプチド 合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロ メチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチ ル樹脂、4ーベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4ーメチルベンズヒド リルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトア ミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニ ルーヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'ージメトキシフェニル 一Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このよ うな樹脂を用い、αーアミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目 的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮 合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除 去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的 の本発明のペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活 性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジ イミド類としては、DCC、N,N'ージイソプロピルカルボジイミド、N-エ チルーN'ー(3ージメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。 これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤 (例えば、HOBt, HOOBt) とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはH OBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の 活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

5

10

15

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド 縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、 N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチル ピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化 炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキ シドなどのスルホキシド類、ピリジン,ジオキサン,テトラヒドロフランなど のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メ チル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用い られる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている 範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。 活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。 ニンヒドリ ン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なう ことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反 応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチル イミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反 応に影響を与えないようにすることができる。

20 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、 Z、 Boc、 tーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、 4ーメトキシベンジルオキシカルボニル、 C1-Z、 Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、 2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmoc などが用いられる。

25 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、 プロピル、プチル、 t ープチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘ プチル、シクロオクチル、 2 ーアダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環 状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、 4-ニトロベンジルエステル、 4-メトキシベンジルエステル、 4-クロロベ

ンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベン ジルオキシカルボニルヒドラジド化、 t ーブトキシカルボニルヒドラジド化、 トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C_{1-6})アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-プチル基などである。

10 チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、 $C1_2$ -Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-プチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、<math>DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5ートリクロロフェノール、2,4ージニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、Nーヒドロキシスクシミド、Nーヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル]などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pdー黒あるいはPdー炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、

20

ジメチルスルフィド、1,4ープタンジチオール、1,2ーエタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4ージニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2ーエタンジチオール、1,4ープタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のαーカルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(ペプチド)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のαーアミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したペプチドとを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の本発明のペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のαーカルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、本発明のペプチドのアミド体と同様にして、所望の本発明のペプチドのエステル体を得ることができる。

25 本発明のペプチドの部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、 あるいは本発明のペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造 することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合 成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドの部分ペプチドを 構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が 保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①~⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide

5 Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

10

15

20

25

②Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドまたはその部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる本発明のペプチドの部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のペプチドをコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の 実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法または それに準じた方法により、本発明のペプチドのmRNAを定量することができ る。

. 本発明のペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライプラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接 Reverse

10 Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

本願明細書において、塩基配列Pとは、以下の9種類の塩基配列から選ばれる1つの塩基配列を示す。

- (1) 配列番号: 7で表される塩基配列、
- 15 (2) 配列番号: 9で表わされる塩基配列の第64番目~336番目の塩基配列、
 - (3)配列番号:10で表わされる塩基配列の第43番目~702番目の塩基配列、
- (4)配列番号:11で表わされる塩基配列の第73番目~498番目の塩基 20 配列、
 - (5) 配列番号:12で表わされる塩基配列の第55番目~724番目の塩基 配列、
 - (6)配列番号:24で表わされる塩基配列の第55番目~408番目の塩基配列、
- 25 (7)配列番号:28で表わされる塩基配列の第52番目~372番目の塩基 配列、
 - (8) 配列番号:39で表わされる塩基配列の第52番目~372番目の塩基 配列、
 - (9) 配列番号: 43で表わされる塩基配列の第52番目~402番目の塩基

配列。

本発明の分泌蛋白質をコードするDNAとしては、例えば塩基配列Pとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

塩基配列Pとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、塩基配列Pと約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

10 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 $19\sim40$ mM、好ましくは約 $19\sim20$ mMで、温度が約 $50\sim70$ $^{\circ}$ C、好ましくは約 $60\sim65$ $^{\circ}$ Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65 $^{\circ}$ Cの場合が最も好ましい。

20 より具体的には、

- (1) 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなる分泌蛋白質AをコードするDNAとしては、配列番号:7で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- (2) 配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列の第22番目〜第112番目の アミノ酸配列からなる分泌蛋白質BをコードするDNAとしては、配列番号: 9で表わされる塩基配列の第64番目〜第336番目の塩基配列からなるDN Aなどが用いられる。
 - (3) 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~第234番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質CをコードするDNAとしては、配列番号:

25

- 10で表わされる塩基配列の第43番目~第702番目の塩基配列からなるD NAなどが用いられる。
- (4) 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~第166番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質DをコードするDNAとしては、配列番号:
- 5 11で表わされる塩基配列の第73番目〜第498番目の塩基配列からなるD NAなどが用いられる。
 - (5) 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目〜第241番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質EをコードするDNAとしては、配列番号:12で表わされる塩基配列の第55番目〜第723番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (6) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目〜第136番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質FをコードするDNAとしては、配列番号:24で表わされる塩基配列の第55番目〜第408番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- 15 (7)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第18番目〜第124番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質GをコードするDNAとしては、配列番号:28で表わされる塩基配列の第52番目〜第372番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- (8) 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目〜第124番目 20 のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質HをコードするDNAとしては、配列番号:39で表わされる塩基配列の第52番目〜第372番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (9)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目〜第134番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質HをコードするDNAとしては、配列番号:43で表わされる塩基配列の第52番目〜第402番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

本願明細書において、塩基配列Qとは、以下の24種類の塩基配列から選ばれる1つの塩基配列を示す。

(1) ①配列番号: 9で表わされる塩基配列の第64番目~111番目の塩基

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

配列、

- ②配列番号:9で表わされる塩基配列の第118番目~165番目の塩基配列、
- (2) ①配列番号:10で表わされる塩基配列の第43番目~63番目の塩基 配列、
- 5 ②配列番号:10で表わされる塩基配列の第76番目~174番目の塩基配列、
 - ③配列番号:10で表わされる塩基配列の第178番目~264番目の塩基配列、
 - ④配列番号:10で表わされる塩基配列の第268番目~321番目の塩基配列、
- 10 ⑤配列番号:10で表わされる塩基配列の第328番目~561番目の塩基配列、
 - ⑥配列番号:10で表わされる塩基配列の第568番目~702番目の塩基配列、
- (3) ①配列番号:11で表わされる塩基配列の第73番目~255番目の塩 15 基配列、
 - ②配列番号:11で表わされる塩基配列の第256番目~342番目の塩基配列、
 - ③配列番号:11で表わされる塩基配列の第343番目~498番目の塩基配列、
- 20 (4) ①配列番号: 1 2 で表わされる塩基配列の第 5 5 番目~1 7 4 番目の塩 基配列、
 - ②配列番号:12で表わされる塩基配列の第187番目~606番目の塩基配列、
- ③配列番号:12で表わされる塩基配列の第613番目~723番目の塩基配 25 列、
 - (5) ①配列番号:24で表わされる塩基配列の第76番目~264番目の塩 基配列、
 - ·②配列番号:24で表わされる塩基配列の第238番目~264番目の塩基配列、

③配列番号:24で表わされる塩基配列の第271番目~399番目の塩基配列、

④配列番号:24で表わされる塩基配列の第379番目~399番目の塩基配列、

(6) ①配列番号:28で表わされる塩基配列の第343番目~366番目の 塩基配列、

②配列番号:28で表わされる塩基配列の第346番目~366番目の塩基配列、

(7) ①配列番号:39で表わされる塩基配列の第343番目~366番目の 10 塩基配列、

②配列番号:39で表わされる塩基配列の第346番目~366番目の塩基配列、

- (8) ①配列番号:43で表わされる塩基配列の第370番目~393番目の 塩基配列、
- 15 ②配列番号: 43で表わされる塩基配列の第373番目~393番目の塩基配列。

本発明のペプチドをコードするDNAとしては、例えば塩基配列Qとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

塩基配列Qとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、塩基配列Qと約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

25 ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と 同様のものが用いられる。

より具体的には、

20

(1) (i) 配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~第37番目のアミノ酸配列からなるペプチドBをコードするDNAとしては、配列番号:

10

25

9で表わされる塩基配列の第64番目〜第111番目の塩基配列からなるDNAなどが、

- (ii) 配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第40番目〜第55番目のアミノ酸配列からなるペプチドBをコードするDNAとしては、配列番号:9で表わされる塩基配列の第118番目〜第165番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- (2) (i) 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第15番目〜第21番目のアミノ酸配列からなるペプチドCをコードするDNAとしては、配列番号: 10で表わされる塩基配列の第43番目〜第63番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- (ii) 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第26番目~第58番目のアミノ酸配列からなるペプチドCをコードするDNAとしては、配列番号: 10で表わされる塩基配列の第76番目~第174番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- 15 (iii) 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第60番目〜第88番目のアミノ酸配列からなるペプチドCをコードするDNAとしては、配列番号: 10で表わされる塩基配列の第178番目〜第264番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- (iv) 配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第90番目~第107番目の
 20 アミノ酸配列からなるペプチドCをコードするDNAとしては、配列番号:1
 0で表わされる塩基配列の第268番目~第321番目の塩基配列からなるDNAなどが、
 - (v) 配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第110番目〜第187番目のアミノ酸配列からなるペプチドCをコードするDNAとしては、配列番号:10で表わされる塩基配列の第328番目〜第561番目の塩基配列からなるDNAなどが、
 - (vi) 配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第190番目〜第234番目のアミノ酸配列からなるペプチドCをコードするDNAとしては、配列番号:10で表わされる塩基配列の第568番目〜第702番目の塩基配列からなる

20

25

DNAなどが用いられる。

- (3) (i) 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目〜第85番目のアミノ酸配列からなるペプチドDをコードするDNAとしては、配列番号:11で表わされる塩基配列の第73番目〜第255番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- (ii) 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第86番目〜第114番目のアミノ酸配列からなるペプチドDをコードするDNAとしては、配列番号:11で表わされる塩基配列の第256番目〜第342番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- 10 (iii) 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第115番目〜第166番目のアミノ酸配列からなるペプチドDをコードするDNAとしては、配列番号:11で表わされる塩基配列の第343番目〜第498番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- (4) (i) 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~第58番目 のアミノ酸配列からなるペプチドEをコードするDNAとしては、配列番号: 12で表わされる塩基配列の第55番目~第174番目の塩基配列からなるDNAなどが、
 - (ii) 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第63番目〜第202番目のアミノ酸配列からなるペプチドEをコードするDNAとしては、配列番号:12で表わされる塩基配列の第187番目〜第606番目の塩基配列からなるDNAなどが、
 - (iii) 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第205番目~第241番目のアミノ酸配列からなるペプチドEをコードするDNAとしては、配列番号:12で表わされる塩基配列の第613番目~第723番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (5) (i) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目〜第88番目のアミノ酸配列からなるペプチドFをコードするDNAとしては、配列番号:24で表わされる塩基配列の第76番目〜第264番目の塩基配列からなるDNAなどが、

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

- (ii) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第80番目〜第88番目のアミノ酸配列からなるペプチドFをコードするDNAとしては、配列番号:24で表わされる塩基配列の第238番目〜第264番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- 5 (iii) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第91番目〜第133番目のアミノ酸配列からなるペプチドFをコードするDNAとしては、配列番号:24で表わされる塩基配列の第271番目〜第399番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- (iv) 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第127番目〜第133番 10 目のアミノ酸配列からなるペプチドFをコードするDNAとしては、配列番 号:24で表わされる塩基配列の第379番目〜第399番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (6) (i) 配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第115番目〜第122番目のアミノ酸配列からなるペプチドGをコードするDNAとしては、配列番号:28で表わされる塩基配列の第343番目〜第366番目の塩基配列からなるDNAなどが、
 - (ii) 配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第116番目~第122番目のアミノ酸配列からなるペプチドGをコードするDNAとしては、配列番号:28で表わされる塩基配列の第346番目~第366番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

20

- (7) (i) 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第115番目~第122番目のアミノ酸配列からなるペプチドHをコードするDNAとしては、配列番号:39で表わされる塩基配列の第343番目~第366番目の塩基配列からなるDNAなどが、
- 25 (ii) 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第116番目〜第122番目のアミノ酸配列からなるペプチドHをコードするDNAとしては、配列番号:39で表わされる塩基配列の第346番目〜第366番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (8) (i) 配列番号: 43で表わされるアミノ酸配列の第124番目~第13

15

25

1番目のアミノ酸配列からなるペプチドIをコードするDNAとしては、配列番号:43で表わされる塩基配列の第370番目~第393番目の塩基配列からなるDNAなどが、

(ii) 配列番号:43で表わされるアミノ酸配列の第125番目〜第131番目のアミノ酸配列からなるペプチドIをコードするDNAとしては、配列番号:43で表わされる塩基配列の第373番目〜第393番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、塩基配列PまたはQを有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または塩基配列PまたはQとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

塩基配列 P または Q とハイブリダイズできる塩基配列は、前記と同意義を示す。

20 ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と 同様のものが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライプラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本願明細書において、塩基配列Rとは、配列番号:8~配列番号:12、配列番号:24、配列番号:28、配列番号:39および配列番号:43から選ばれる1つの配列番号で表される塩基配列を示す。

15

本発明の前駆体蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、塩基配列Rを含有するDNAの塩基配列を有するDNA、または塩基配列Rとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明の前駆体蛋白質と実質的に同質の活性を有する前駆体蛋白質をコードするDNAの塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

塩基配列Rとハイブリダイズできる塩基配列は、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と 同様のものが用いられる。

より具体的には、

- 10 (1)配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質AをコードするDNAとしては、配列番号: 8で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (2)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質BをコードするDNAとしては、配列番号:9で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (3)配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質CをコードするDNAとしては、配列番号: 10で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- (4)配列番号:5で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質Dをコード 20 するDNAとしては、配列番号:11で表わされる塩基配列からなるDNAな どが用いられる。
 - (5)配列番号:6で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質EをコードするDNAとしては、配列番号:12で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- 25 (6)配列番号: 23で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質FをコードするDNAとしては、配列番号: 24で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
 - (7)配列番号:27で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質GをコードするDNAとしては、配列番号:28で表わされる塩基配列からなるDNA

15

20

25

などが用いられる。

- (8)配列番号:38で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質HをコードするDNAとしては、配列番号:39で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。
- 5 (9)配列番号:42で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質IをコードするDNAとしては、配列番号:43で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

本発明のペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明のペプチド遺伝子の複製または発現を阻害すること のできるアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)を、クローン化した、ある いは決定された本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列情報に基づき 設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド(核酸)は、本発明のペプチ ド遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機 能を阻害することができるか、あるいは本発明のペプチド関連RNAとの相互 作用を介して本発明のペプチド遺伝子の発現を調節・制御することができる。 本発明のペプチド関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、 および本発明のペプチド関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができ るポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のペプチド遺伝子の発現 を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用であ る。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核 酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌク レオチド、塩基配列または核酸とペプチド(蛋白質)との間で「対応する」と は、ヌクレオチド(核酸)の配列またはその相補体から誘導される指令にある ペプチド(蛋白質)のアミノ酸を通常指している。本発明のペプチド遺伝子の 5'端へアピンループ、5'端6ーベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ペプ チド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳

領域、3'端パリンドローム領域、および3'端へアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、本発明のペプチド遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関 5 係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、 「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチ ドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リ ボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチ 10 ド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列 特異的な核酸ポリマー) または特殊な結合を含有するその他のポリマー (但し、 該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の 付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それ らは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにD NA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド 15 (または非修飾オリゴヌクレオチド)、さらには公知の修飾の付加されたもの、 例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化 されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内 ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチルホスホネ・ ート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど) を持つ 20 もの、電荷を有する結合または硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、 ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えば蛋白質(ヌクレアーゼ、ヌク レアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリ ジンなど)や糖(例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有している もの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持 25 つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化 性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結 合を持つもの(例えば、αアノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌ クレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジ

15

20

25

ン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに 開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピド、コレステロールなど)といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸

の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、R Naseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。

5 こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレン グリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護 基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のペプチドの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明のペプチドをコードするDNAは、自体公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの(例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識)、ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。

15

本発明のペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、 本発明のペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体 公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDN Aを本発明のペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは 20 合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別す ることができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・ クローニング(Molecular Cloning) 2 nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市 販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行 なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km (宝酒造(株))、Mutan™-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

10

15

20

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス, ワクシニアウイルス, バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿

主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amprと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neorと略称する場合がある、G418耐性)等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

5

10

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Pho A・シグナル配列、Omp A・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

20 このようにして構築された本発明のペプチドをコードするDNAを含有する ベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、 昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ

(Escherichia coli) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 60巻, 160(1968)] , JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research) , 9巻, 309(1981)] , JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of

25

PCT/JP02/08872 WO 03/020932

Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナ ル・オプ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459(1969)], C6 00 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用 いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) 5 MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナ ル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1 984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20 B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NC YC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) K M71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫 15 由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; S f 細胞)、Trichoplusia ni の 中腸由来のMG 1 細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High Five™細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞またはEstigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウ イルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N 細胞; BmN 細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 20 213-217,(1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャ - (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7(COS7),Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記), dhfr遺 伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr^{*}) 細胞 と略記),マウスL細胞,マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞,ラッ トGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・

20

25

ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 6 9巻, 2 1 1 0 (1 9 7 2) やジーン (Gene), 1 7巻, 1 0 7 (1 9 8 2) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネ
 ラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 11
 1(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) ,194巻,182-187 (1991) 、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) ,75巻,1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

15 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール. 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM 9 培地〔ミラー(Miller),ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics),431-433,Cold Spring Harbor LaboHumanory,New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β ーインドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

10 宿主がパチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

15

20

25

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] があげられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C.,ネイチャー (Nature),195,788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地[サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地[ヴィロロジー(Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地[ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・

メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻,519(1967)] ,199培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine),73巻,1(1950)] などが用いられる。p Hは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

5

15

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明 のペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法 10 により行なうことができる。

本発明のペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100 Mなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知 の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で 得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体ま たは他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

本発明のペプチドに対する抗体(以下、単に本発明の抗体と称する場合がある)は、本発明のペプチドに対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のペプチドに対する抗体は、本発明のペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

10

25

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位に それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能 を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバント を投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行わ れる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモッ ト、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよび ラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法[ネイチャー(Nature)、256、495 (1975)]に従

い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコ ール(PEG)やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが 用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。 用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1: $1\sim20:1$ 程度であり、PEG (好ましくはPEG1000 \sim PEG6000)が10 \sim 80%程度の濃度で添加され、20 \sim 40 \sim 6、好ましくは30 \sim 37 \sim 7 で1 \sim 10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

5

10

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ペプチド(蛋白質)抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

20 モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRP MI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリ

5

15

20

25

ドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

10 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(ペプチド抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリア一蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルプミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、 完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。 投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なわれる。 ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定 と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のペプチドをコードするDNA(以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある)に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA(以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある)としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

10

15

20

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列(すなわち、本発明のDNAの相補鎖)の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列(例えば、開始コドン付近の塩基配列など)の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

以下に、①本発明のペプチド、②本発明のDNA、③本発明の抗体、および ④アンチセンスDNAの用途を説明する。

25 (1) 本発明のペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のペプチドまたは本発明のDNAは、本発明のペプチドまたは本発明のDNAに異常があったり、欠損している場合、例えば、本発明のペプチドの機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

5

10

15

20

25

例えば、本発明の分泌蛋白質F、本発明のペプチドFもしくはその部分ペプ チド、本発明の前駆体蛋白質F、またはそのアミドもしくはそのエステルまた はその塩(以下、本発明のペプチドFと略記する場合がある)、①本発明の分 泌蛋白質G、本発明のペプチドGもしくはその部分ペプチド、本発明の前駆体 蛋白質G、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩(以下、本発 明のペプチドGと略記する場合がある)、②本発明の分泌蛋白質H、本発明の ペプチドHもしくはその部分ペプチド、本発明の前駆体蛋白質H、またはその アミドもしくはそのエステルまたはその塩(以下、本発明のペプチドHと略記 する場合がある)、③本発明の分泌蛋白質 I、本発明のペプチド I もしくはそ の部分ペプチド、本発明の前駆体蛋白質I、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩(以下、本発明のペプチドIと略記する場合がある)はA Q27受容体と結合することができるので、本発明のF、G、HまたはIおよ びそれらをコードするDNAは、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌 調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌促進剤)、摂 食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発 行動調節剤、情動行動調節剤などとして有用である。

また、本発明のF、G、Hまたは I およびそれらをコードするDNAは、例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)の予防・治療剤などとして有用である。

本発明のペプチドF、G、HまたはIはOT7T022受容体と結合することができるので、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよびそれらをコードするDNAは、安全で低毒性な医薬、例えば、プロラクチン分泌調節剤として有用である。すなわち、本発明のペプチドF、G、HまたはIがプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよびそれらをコードするDNAはプロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌

不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、 更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌 に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明の ペプチドF、G、Hまたは I がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、本 発明のペプチドF、G、Hまたは I およびそれらをコードする DNA はプロラ クチン分泌促進作用に基づく性欲促進作用(フェロモン的作用)を有するため、 性欲促進剤としても有用である。

5

25

本発明のペプチドF、G、HまたはIがプロラクチン分泌抑制作用を有する 場合は、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよびそれらをコードするDN Aはプロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾 10 患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、スト レス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、 乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アル ゴンツーデル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブ 15 ライト(Forbes-Albright)症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または 精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬 として有用である。さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIがプロラク チン分泌抑制作用を有する場合は、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよ びそれらをコードするDNAはプロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬 としても有用である。 20

その他、本発明のペプチドF、G、HまたはIはプロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用できる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIは、胎盤機能調節作用を有するため、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよびそれらをコードするDN Aは絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬としても有用である。

プロラクチン分泌調節活性については、Neuroendocrinology, 62巻 1995年 198-206頁、または、Neuroscience Letters 203巻 1996年 164-170 頁などに記載の方法またはそれに準じた方法により測定することができる。

WO 03/020932

10

15

20

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよびそれらをコードするDNAは、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎,急性心筋梗塞,急性膵炎,急性ウイルス脳炎,成人呼吸促迫症候群,アルコール性肝炎,アルツハイマー病,喘息,動脈硬化,アトピー性皮膚炎,バクテリア肺炎,膀胱がん,骨折,乳がん,過食症,多食症,火傷治癒,子宮頸部がん,慢性リンパ性白血病,慢性骨髄性白血病,慢性膵炎,肝硬変,

大腸がん(結腸/直腸がん),クローン病,痴呆,糖尿病性合併症,糖尿病性腎症,糖尿病性神経障害,糖尿病性網膜症,胃炎,ヘリコパクター・ピロリ感染症,肝不全,A型肝炎,B型肝炎,C型肝炎,肝炎,単純ヘルペスウイルス感染症,水痘帯状疱疹ウイルス感染症,ホジキン病,エイズ感染症,ヒトパピローマウイルス感染症,高カルシウム血症,高コレステロール血症,高グリセリド血症,高脂血症,感染症,インフルエンザ感染症,インシュリン依存性糖尿病(I型),侵襲性ブドウ状球菌感染症,悪性黒色腫,がん転移,多発性骨髄腫,アレルギー性鼻炎,腎炎,非ホジキン性リンパ腫,インシュリン非依存性糖尿病(II型),非小細胞肺がん,臓器移植,骨関節炎,骨軟化症,骨減少症,骨粗鬆症,卵巣がん,骨ペーチェット病,消化性潰瘍,末梢血管疾患,前立腺がん,逆流性食道炎,腎不全,リウマチ関節炎,精神分裂症,敗血症,敗血症ショック,重症全身性真菌感染症,小細胞肺がん,脊髄損傷,胃がん,全身性エリテマトーサス,一過性脳虚血発作,結核,心弁膜症,血管性/多発梗塞痴呆,創傷治癒,不眠症,関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよびそれらをコードするDN Aは、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)の疾病の治療・予防剤などの 医薬として使用することができる。

または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などとして有用できる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIおよびそれらをコードするD NAは、例えば、(1) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性(非機能性) 5

10

15

20

25

下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲 状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インス リノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、(2)インスリン依存性または 非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿 病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症 候群、起立性低血圧症など)の治療薬、(3)高インスリン血症の改善または 食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、(4)急性膵炎、慢性膵炎、 膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食 道炎などの治療薬、 (5) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の 改善剤(例、ガストリン分泌昂進の抑制剤など)、(6)内視鏡胆道膵管造影 に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、(7) 小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因する下痢(例、 Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、 先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因 する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に 起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身 性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、(8) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、 (9) 腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、 非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、 骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌 など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨 髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬;該治療 薬は、単独または他の制癌剤(例、タモキシフエン、LHRHアゴニスト、L HRHTンタゴニスト、インターフェロン $-\alpha$ 、 β および γ 、インターロイキ ンー2など)と併用して用いることができる、(10)肥大性心筋症、動脈硬 化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再 血管形成の予防・治療薬、(11)食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の 治療薬、(12)免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒ

キニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性また は局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、 日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎 など) など) の治療薬、(13)神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすこ とから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴 呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障 害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14)眼疾患(例、緑内障など) などの治療薬、(15)急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸 促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、 肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS 感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多 発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不全、敗 血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセ リド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコー ル性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16)臓器移植、火傷、創 傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17)慢性あるいは急性疼痛(例、 術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など) にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

10

15

20

25

本発明のペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、生体内において本発明のペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のペプチドを発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のペプチドを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDN

Aは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも 90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましく は99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

5

10

本発明のペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、 エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくは それ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射 剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のペプチドを生理学的に認め られる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などととも に一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによっ て製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の 適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

25 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、Dーソルビトール、Dーマンニトール、塩化ナトリウムなど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート8

PCT/JP02/08872

O™、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴ マ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジル アルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、 酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩 酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレング リコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、 酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプ ルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非 10 経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトま たは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、 ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など)に対して投与することができる。 本発明のペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより 差異はあるが、例えば、本発明のペプチドを経口投与する場合、一般的に成人 15 (60kg として) においては、一日につき該ペプチドを約0.1~100mg、 好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。 非経口的に投与する場合は、該ペプチドの1回投与量は投与対象、対象疾患な どによっても異なるが、例えば、本発明のペプチドを注射剤の形で成人(体重 60kgとして)に投与する場合、一日につき該ペプチドを約0.01~30 20 mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~1Omg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物 の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(2)疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のペプチドは、本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物 25 またはその塩のスクリーニング方法に使用することができる。

また、本発明のDNAは、本発明のペプチドの発現を促進または阻害する化 合物またはその塩のスクリーニング方法に使用することができる。

以下に、本発明のペプチドまたは本発明のDNAを用いるスクリーニング方

法を具体的に説明する。

(2-1) 本発明のペプチドの受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法

該スクリーニングは、本発明のペプチドを用いるか、または組換え型本発明 のペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を 5 用いることによって、本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合 物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)(例えば、ペプチ ド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など) またはその 塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、本発明のペプ 10 チドの受容体を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコ リン遊離、細胞内Ca *遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノ シトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pHの低下、GTP y S結合活性などを促進する活性など)を有す る化合物(即ち受容体アゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(即ち 受容体アンタゴニスト)などが含まれる。「リガンドとの結合性を変化させる」 15 とは、リガンドとの結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の 両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、

20

25

本発明のペプチドを用いることを特徴とする本発明のペプチドの活性を促進 または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、具体的には、

(i) 受容体またはその部分ペプチド(以下、これらを単に受容体と略称する) に、本発明のペプチドを接触させた場合と(ii) 受容体に、本発明のペプチド および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明 のペプチドと受容体の結合性を変化させる化合物 (本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物) またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i)受容体に、本発明のペプチドを接触させた場合と(ii)受容体に、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば受容体に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

本発明のスクリーニング方法は具体的には、

5

10

25

①標識した本発明のペプチドを、受容体に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を受容体に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリーニング方法、②標識した本発明のペプチドを、受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明のペプチドを、受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した受容体に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した受容体に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリーニング方法、

④受容体を活性化する化合物(例えば、本発明のペプチド)を受容体を含有する細胞に接触させた場合と、受容体を活性化する化合物および試験化合物を受容体を含有する細胞に接触させた場合における、受容体を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内 cAMP生成、細胞内 cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本

発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリー ニング方法、および

⑤受容体を活性化する化合物(例えば、本発明のペプチドなど)を受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した受容体に接触させた場合と、受容体を活性化する化合物および試験化合物を、受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した受容体に接触させた場合における、受容体を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca **遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリーニング方法などである。

15 本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

5

10

20

25

ことができる。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる受容体としては、本発明のペプ チドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよいが、ヒ トや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器 は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、 組換之体を用いて大量発現させた受容体などが適している。受容体は、公知の

方法に従って製造することができる。 本発明のスクリーニング方法において、受容体を含有する細胞あるいは該細

受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマ リンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行う

受容体を含有する細胞としては、受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿 主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙 げられる。また、受容体を発現した宿主細胞は、前述の本発明のペプチドを含 有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica 社製)による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

5

10

15

20

25

該受容体を含有する細胞や膜画分中の受容体の量は、1 細胞当たり 10^{8} ~ 10^{8} 分子であるのが好ましく、 10^{5} ~ 10^{7} 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、適当な受容体画分と、標識した本発明のペプチドなどが用いられる。受容体画分としては、天然型の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば〔³H〕、〔¹²⁵ I〕、〔¹⁴ C〕、〔³⁵ S〕などで標識されたリガンドなどを利用することができる。このうち好ましくは、〔¹²⁵ I〕で標識されたリガンドである。

具体的には、本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、

スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調 製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バ ッファー、トリスー塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻 害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させ る目的で、CHAPS、Tween-80™(花王-アトラス社)、ジギトニン、 デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さら に、プロテアーゼによる受容体や本発明のペプチドの分解を抑える目的でPM SF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプ ロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセ プター溶液に、一定量 (5000cpm~50000cpm) の標識した本 10 発明のペプチドを添加し、同時に10⁻¹⁰~10⁻⁷Mの試験化合物を共存させる。 非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の本発明のペプチドを 加えた反応チューブも用意する。反応は0°から50°、望ましくは4°から 37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガ ラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙 に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはソーカウンター で計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B₀)から非特異的結合量 (N SB) を引いたカウント (B。-NSB) を100%とした時、特異的結合量 (B NSB)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物 質として選択することができる。

15

20

25

本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチ ドの活性を促進または阻害する化合物)をスクリーニングする前記の④~⑤の 方法を実施するためには、受容体を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン 酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca ギ遊離、細胞内cAMP生成、細胞内 c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリ ン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPyS結合活性などを促進す る活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用 いて測定することができる。具体的には、まず、受容体を含有する細胞をマル チウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって

新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

5

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な受容体を発現 10 した細胞が必要である。受容体を発現した細胞としては、前述の受容体発現細 胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあ げられる。

- 15 また、試験化合物としては、受容体の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。受容体の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。
- 20 さらに、本発明のペプチドに代えて、本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることもできる。本発明のペプチドと 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩は、例えば、リガンドとし て本発明のペプチドを用いて、後述する本発明のスクーニング方法を実施する ことによって得ることができる。
- 25 本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)またはその塩のスクリーニング用キットは、受容体またはその塩、受容体の部分ペプチドまたはその塩、受容体を含有する細胞、あるいは受容体を含有する細胞の膜画分、および本発明のペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清ア がブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45μ mのフィルターで濾過滅菌し、 $4 \mathbb{C}$ で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②受容体標品

受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10 ⁵個/穴で継代 10 し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識した本発明のペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを 4° のるいは -20° にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1^{\circ}\mu$ Mに希釈する。

15 ④リガンド標準液

本発明のペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

25

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した受容体を発現させた細胞を、測定用 20 緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。
 - ② 10^{-3} ~ 10^{-10} Mの試験化合物溶液を $5\mu1$ 加えた後、標識した本発明のペプチドを $5\mu1$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mの本発明のペプチドを $5\mu1$ 加えておく。
 - ③反応液を除去し、1m1の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のペプチドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。
 - ④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB)を次の式〔数1〕で求める。〔数1〕

10

20

25

 $PMB = [(B-NSB) / (B_0-NSB)] \times 100$

PMB: Percent Maximum Binding

B:検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

5 B。:最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のペプチドと受容体との結合を変化させる(結合を阻害あるいは促進する)化合物(本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物)であり、具体的には受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(いわゆる受容体アゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物(いわゆる受容体アンタゴニスト)である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 15 上記受容体アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法 は以下の(i)または(ii)に従えばよい。
 - (i) 前記①~③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドと受容体との結合性を変化させる(特に、結合を阻害する)化合物を得た後、該化合物が上記した受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は受容体アゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は受容体アンタゴニストである。
 - (ii) (a)試験化合物を受容体を含有する細胞に接触させ、上記受容体を介した 細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は受容体 アゴニストである。
 - (b) 受容体を活性化する化合物(例えば、本発明のペプチドアゴニストなど) を受容体を含有する細胞に接触させた場合と、受容体を活性化する化合物およ び試験化合物を受容体を含有する細胞に接触させた場合における、受容体を介 した細胞刺激活性を測定し、比較する。受容体を活性化する化合物による細胞

刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は受容体アンタゴニストである。 該受容体アゴニストは、受容体に対する本発明のペプチドが有する生理活性 と同様の作用を有しているので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医 薬として有用である。

5 逆に、受容体アンタゴニストは、受容体に対する本発明のペプチドが有する 生理活性を抑制することができるので、本発明のペプチドの生理活性を抑制す るための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用い られる。

15 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、 懸濁液剤などとすることができる。

20 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) に対して投与することができる。 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、受容体アンタゴニストを経口投与する 場合、一般的に成人 (体重60kg当たり) においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、受容体アンタゴニストを注射剤の形で通常成人 (60kg当たり) に投与する場合、一日につき該化

合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。より具体的には、本発明のペプチドが、本発明のペプチドド、G、HまたはIである場合、受容体としては、

5

- (1)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩(以下、AQ27受容体と略記する場合がある)、
- 10 (2)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩(以下、OT7T022受容体と略記する場合がある)などが用いられる。

配列番号:31、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:33または 配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号:31、配列番号:44、配列番号:46、配列番号: 33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

20 本発明の配列番号:31、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:3 3または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸 配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号:31、配列番号:44、 配列番号:46、配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸 配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号:31、配列番号:44、 配列番号:46、配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸 配列からなる蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用など

の活性が同等(例、約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性 の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、前記と同様 にして測定することができる。

5 また、AQ27受容体またはOT7T022受容体としては、①配列番号: 31、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:33または配列番号:3 5で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個 程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個 (1または2個)) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:31、配列番号:44、配 列番号:46、配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配 10 列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~1 0個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が付加したア ミノ酸配列、③配列番号:31、配列番号:44、配列番号:46、配列番号: 33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好 15 ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましく は数個(1または2個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配 列、または④それら欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列を含有する 蛋白質なども用いられる。

AQ27受容体またはOT7T022受容体は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号:31、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質をはじめとするAQ27受容体またはOT7T022受容体は、C末端が通常カルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-プチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロペキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha-$ ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどの

フェニルー C_{1-2} アルキル基もしくは α ーナフチルメチルなどの α ーナフチルー C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

AQ27受容体またはOT7T022受容体がC末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化ま たはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエス テルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、AQ27受容体またはOT7T022受容体には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

10

15

20

AQ27受容体の具体例としては、例えば、配列番号:31で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来AQ27受容体、配列番号:44で表わされるアミノ酸配列からなるラット由来AQ27受容体、配列番号:46で表わされるアミノ酸配列からなるマウス由来AQ27受容体などがあげられる。

OT7T022受容体の具体例としては、例えば、配列番号:33で表わされるアミノ酸配列からなるラット由来OT7T022受容体、配列番号:35で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来OT7T022受容体などがあげられる。

25 AQ27受容体またはOT7T022受容体の部分ペプチドとしては、前記したAQ27受容体またはOT7T022受容体の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、AQ27受容体またはOT7T022受容体の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

AQ27受容体またはOT7TO22受容体の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

5

25

AQ27受容体またはOT7T022受容体の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記したAQ27受容体またはOT7T022受容体の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

10 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、AQ27受容体またはOT7T022受容体の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、より好ましくは1~5個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、AQ27受容体またはOT7T022受容体の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート $(-COO^-)$ 、アミド $(-CONH_2)$ またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

さらに、AQ27受容体またはOT7T022受容体の部分ペプチドには、 前記したAQ27受容体またはOT7T022受容体と同様に、N末端のメチ オニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断 され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上 の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわ ゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

AQ27受容体またはOT7T022受容体またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

AQ27受容体またはOT7T022受容体をコードするDNAとしては、前述したAQ27受容体またはOT7T022受容体をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

10

15

20

25

具体的には、AQ27受容体をコードするDNAとしては、例えば、配列番号:32、配列番号:45、配列番号:47で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号:32、配列番号:45、配列番号:47で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号:31、配列番号:44、配列番号:46で表わされるアミノ酸配列からなるAQ27受容体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有する受容体をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号:32、配列番号:45、配列番号:47で表わされる塩基配列を 含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA としては、例えば、配列番号:32、配列番号:45、配列番号:47で表わ される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

より具体的には、配列番号:31で表わされるアミノ酸配列からなるヒトA Q27受容体をコードするDNAとしては、配列番号:32で表わされる塩基 配列からなるDNAなどが用いられる。

より具体的には、配列番号:44で表わされるアミノ酸配列からなるラット AQ27受容体をコードするDNAとしては、配列番号:45で表わされる塩 基配列からなるDNAなどが用いられる。

10 より具体的には、配列番号:46で表わされるアミノ酸配列からなるマウス AQ27受容体をコードするDNAとしては、配列番号:47で表わされる塩 基配列からなるDNAなどが用いられる。

OT7T022受容体をコードするDNAとしては、例えば、

- (1)配列番号:34で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号:34で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号:33で表わされるアミノ酸配列からなるOT7T022受容体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有する受容体をコードするDNA、または
- 20 (2)配列番号:36または配列番号:37で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号:36または配列番号:37で表わされる塩基配列を 有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを 有し、配列番号:35で表わされるアミノ酸配列からなるOT7T022受容 体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有する受容体をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号:34、配列番号:36または配列番号:37で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号:34、配列番号:36または配列番号:37で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好まし

15

くは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70 $^{\circ}$ 、好ましくは約60~65 $^{\circ}$ の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65 $^{\circ}$ の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号:31で表わされるアミノ酸配列を含有するAQ27受容体をコードするDNAとしては、配列番号:32で表わされる塩基配列を含有するDNAが用いられる。

配列番号:33で表わされるアミノ酸配列からなるラットOT7T022受容体をコードするDNAとしては、配列番号:34で表わされる塩基配列からなるDNAが用いられる。

配列番号: 35で表わされるアミノ酸配列からなるヒトOT7T022受容 20 体をコードするDNAとしては、配列番号: 36または配列番号: 37で表わ される塩基配列からなるDNAが用いられる。

ヒトAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩は、WO01/163 16号公報に記載の方法に準じて製造することができる。

OT7T022受容体、その部分ペプチドまたはその塩は、WO00/2925 441号公報に記載の方法に準じて製造することができる。

ラットまたはマウスAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩は、新規な蛋白質であり、WO01/16316号公報に記載の方法に準じて製造することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られ

る本発明のペプチドF、G、HまたはIとAQ27受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩は、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌調節剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤などとして有用である。

5

10

15

20

25

また、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるAQ27受容体アゴニストは、安全で低毒性な医薬、例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)の予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌促進剤などとして有用である。

一方、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるAQ27受容体アンタゴニストは、安全で低毒性な医薬、例えば、本発明のペプチドFの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌阻害剤などとして有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるOT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストはプロラクチン分泌の調節作用剤として有用である。すなわち、OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストがプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストがプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進作用に基

づく性欲促進作用(フェロモン的作用)を有するため、性欲促進剤としても有用である。

OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストがプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Fronnel)症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ(Argonz-del Castilo)症候群、フォーベス・アルブライト(Forbes-Albright)症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストがプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

15 その他、OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストは、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用できる。

20 さらに、OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストは、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬としても有用である。

プロラクチン分泌調節活性については、Neuroendocrinology, 62 巻 1995 年 198-206 頁、または、Neuroscience Letters 203 巻 1996 年 164-170 頁などに 記載の方法またはそれに準じた方法により行うことができる。

25

さらに、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるOT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストは、安全で低毒性な医薬、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、

5

10

15

20

白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎,急性心筋梗塞,急性膵炎,急性ウイ ルス脳炎,成人呼吸促迫症候群,アルコール性肝炎,アルツハイマー病,喘息, 動脈硬化,アトピー性皮膚炎,バクテリア肺炎,膀胱がん,骨折,乳がん,過 食症,多食症,火傷治癒,子宮頸部がん,慢性リンパ性白血病,慢性骨髄性白 血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、 糖尿病性合併症, 糖尿病性腎症, 糖尿病性神経障害, 糖尿病性網膜症, 胃炎, ヘリコバクター・ピロリ感染症, 肝不全, A型肝炎, B型肝炎, C型肝炎, 肝 炎, 単純ヘルペスウイルス感染症, 水痘帯状疱疹ウイルス感染症, ホジキン病, エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレス テロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、 インシュリン依存性糖尿病 (I型),侵襲性プドウ状球菌感染症,悪性黒色腫, がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、 インシュリン非依存性糖尿病(II 型),非小細胞肺がん,臓器移植,骨関節炎, 骨軟化症,骨減少症,骨粗鬆症,卵巣がん,骨ペーチェット病,消化性潰瘍、 末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分 裂症,敗血症,敗血症ショック,重症全身性真菌感染症,小細胞肺がん、脊髄 損傷,胃がん,全身性エリテマトーサス,一過性脳虚血発作,結核,心弁膜症, 血管性/多発梗塞痴呆,創傷治癒,不眠症,関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、 瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として 有用できる。

また、OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アンタゴニストは、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、OT7T022受容体アゴニストまたはOT7T022受容体アン25 タゴニストは、例えば、(1)先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、(2)インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわ

5

10

15

20

25

PCT/JP02/08872 WO 03/020932 139

ち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ド ーン症候群、起立性低血圧症など)の治療薬、(3)高インスリン血症の改善 または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、 (4) 急性膵炎、慢 性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、 逆流性食道炎などの治療薬、 (5) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々 な症状の改善剤(例、ガストリン分泌昂進の抑制剤など)、(6)内視鏡胆道 膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、 (7)小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因する下痢 (例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因す る下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫 傷に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植 片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下 痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、 (8) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治 療薬、(9)腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞 肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラ ノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、 腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、 慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬; 該治療薬は、単独または他の制癌剤(例、タモキシフエン、LHRHアゴニス ト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロンーα、βおよびγ、インター ロイキンー2など)と併用して用いることができる、(10)肥大性心筋症、 動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、 再血管形成の予防・治療薬、(11)食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患 の治療薬、(12)免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タ ヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性ま たは局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せ ん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性 鼻炎など)など)の治療薬、(13)神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼ

すことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年 期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不 安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14)眼疾患(例、緑内障 など)などの治療薬、(15)急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成 人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、 骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、A IDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転 移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不 全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高 グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、ア ルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16)臓器移植、火 傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17)慢性あるいは急性疼 痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リウマチ、骨粗 鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

これらの医薬は前記と同様に製剤化して、使用することができる。

(2-2) 本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物のスクリー ニング方法

本発明のタンパク質、本発明のオリゴヌクレオチド、本発明の形質変換体ま たは本発明の抗体は、本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物 のスクリーニング法に使用することができる。

すなわち、本発明は、

5

10

15

20

(25

(i) 本発明のタンパク質を発現し得る細胞または組織を、試験化合物の存在 下および非存在下で培養した場合における、それぞれの本発明のタンパク質の 発現量または本発明のタンパク質をコードするmRNA量を測定し、比較する ことを特徴とする本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物のス クリーニング方法を提供する。

本発明のタンパク質を発現し得る細胞または組織としては、ヒトや温血動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、 ウシ、サル等)の細胞(例えば、神経細胞、内分泌細胞、神経内分泌細胞、グ

リア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、肝細胞、脾細胞、メサンギウム細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、樹状細胞)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等、もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸(精巣)、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等を用いても良い。その際、株化細胞、初代培養系を用いてもよい。また、前記した本発明の形質転換された形質変換体を使用してもよい。

5

10

20

25

本発明のペプチドを発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変 15 換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、前記の試験化合物の他、DNAライブラリーなどを用いることができる。

本発明のペプチドの発現量は抗体などを用いて免疫化学的方法などの公知の方法により測定することもできるし、本発明のペプチドをコードするmRNAをノザンハイブリダイゼーション法、RT-PCRやTaqMan PCR法を用いて、公知の方法により測定することもできる。

mRNAの発現量の比較をハイブリダイゼーション法によって行うには、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。

具体的には、本発明のペプチドをコードするmRNAの量の測定は、公知の 方法に従って細胞から抽出したRNAと、本発明のポリヌクレオチドもしくは その一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドとを接触させ、本発明 のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレ オチド結合したmRNAの量を測定することによって行われる。本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを、例えば放射性同位元素、色素などで標識することによって、本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドに結合したmRNAの量が容易に測定できる。放射性同位元素としては、例えば32P、3Hなどが用いられ、色素としては、例えばfluorescein、FAM (PE Biosystems 社製)、JOE (PE Biosystems 社製)、TAMRA (PE Biosystems 社製)、ROX (PE Biosystems 社製)、Cy 3 (Amersham 社製) などの蛍光色素が用いられる。

10 また、mRNAの量は、細胞から抽出したRNAを逆転写酵素によって c D NAに変換した後、本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRによって、 増幅される c DNAの量を測定することによって行うことができる。

このように、本発明のペプチドをコードするmRNAの量を増加させる試験 化合物を、本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物として選択 することができ、また本発明のペプチドをコードするmRNAの量を減少させ る試験化合物を、本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物とし て選択することができる。

さらに、本発明は、

5

15

20 (ii) 本発明のペプチドをコードする遺伝子のプロモーター領域またはエンハンサー領域の下流にレポーター遺伝子を連結した組換えDNAで形質転換した 形質転換体を試験化合物の存在下および非存在下で培養した場合における、それぞれのレポーター活性を測定し、比較することを特徴とする当該プロモーター活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法を提供する。

25 レポーター遺伝子としては、例えば、1 a c Z (β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、成長因子、 β -グルクロニダーゼ、アルカリホスファターゼ、Green fluorescent protein (GFP)、 β -ラクタマーゼなどが用いられる。

レポーター遺伝子産物(例、mRNA、タンパク質)の量を公知の方法を用

いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物を本発明のペプチドのプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御(特に促進)する作用を有する化合物、すなわち本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物として選択できる。逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物を本発明のペプチドのプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御(特に阻害)する作用を有する化合物、すなわち本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物として選択することができる。

試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。

15

20

25

形質転換体の培養は、前記の本発明の形質転換体と同様にして行うことがで 10 きる。

レポーター遺伝子のベクター構築やアッセイ法は公知の技術に従うことができる(例えば、Molecular Biotechnology 13, 29-43, 1999)。

本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物は、本発明のペプチドの作用を増強することができるので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物は、本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、本発明のペプチドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまた

は温血動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) に対して投与することができる。 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のペプチドの発現を促進する化 合物を経口投与する場合、一般的に成人 (体重60kg当たり) においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のペプチドの発現を促進する化合物を注射剤の形で通常成人 (60kg 当たり) に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

より具体的には、本発明のペプチドが、本発明のペプチドF、G、Hまたは I である場合、本発明のペプチドF、G、Hまたは I の発現を促進または阻害 する化合物またはその塩は、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌調節剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤などとして有用である。

一方、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を阻害する化合物または その塩は、安全で低毒性な医薬、例えば、本発明のペプチドFの過剰な産生に

10

20

25

よって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例 えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防・治療剤、副 腎皮質ホルモン分泌阻害剤などとして有用である。

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する化合物またはその塩は、プロラクチン分泌の調節作用剤として有用である。すなわち、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明のペプチドFの発現を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進作用に基づく性欲促進作用(フェロモン的作用)を有するため、性欲促進剤としても有用である。

15 本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、

キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト(Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

その他、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する 化合物またはその塩は、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、 また、ウシ、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬

10

15

20

としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用できる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する 化合物またはその塩は、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、 侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発 の予防または治療薬としても有用である。

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する化合物またはその塩は、安全で低毒性な医薬、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎,急性心筋梗塞,急性膵炎,

急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病(I型)、侵襲性ブドウ状球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型)、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、

25 小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性/多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・ 予防剤などの医薬として有用できる。

また、本発明のペプチドF、G、Hまたは I の発現を促進または阻害する化

10

15

20

25

合物またはその塩は、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)の疾病の治療・ 予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現を促進または阻害する 化合物またはその塩は、例えば、(1) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌 性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピン)産 生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産 生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、 (2) インスリ ン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、 すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障 害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)の治療薬、(3)高インスリン血症 の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、(4)急性膵 炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過 多症、逆流性食道炎などの治療薬、(5)ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴 う様々な症状の改善剤(例、ガストリン分泌昂進の抑制剤など)、(6)内視 鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後 治療薬、(7)小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因 する下痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物 に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経 内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対 宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起 因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢など の治療薬、(8) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾 患などの治療薬、(9)腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺 癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵 巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫 瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リン パ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)な どの治療薬:該治療薬は、単独または他の制癌剤(例、タモキシフエン、LH RHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロンー α 、 β および

γ、インターロイキンー2など)と併用して用いることができる、(10)肥 大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術 後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、(11)食道静脈癌出血、肝硬 変、末梢血管疾患の治療薬、(12)免疫系に作用する生理活性物質(例、サ ブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、 5 例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマ チ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚 炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13)神経調節因子の産生・ 分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アル 10 ツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、 うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14)眼疾 患(例、緑内障など)などの治療薬、(15)急性バクテリア髄膜炎、急性ウ イルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、 結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝 炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエ 15 ンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ベーチェッ ト症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレス テロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過 性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(1 6) 臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17)慢 20 性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、 リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤として も有用である。

これらの医薬は前記と同様に製剤化して、使用することができる。

25 (2-3) 本発明のペプチドの酵素活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明のペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドの 酵素活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法に使 用することができる。

20

すなわち、本発明は、

- (i)本発明のペプチドに、試験化合物の存在下および非存在下で基質を添加した場合における、それぞれの生成物の生産量または生成物の活性を測定し、 比較することを特徴とする本発明のペプチドの酵素活性を促進または阻害する 化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- (ii) ①本発明のペプチドを発現し得る細胞にRI標識化された基質を接触させて培養した場合と②本発明のペプチドを発現し得る細胞にRI標識化された基質および試験化合物を接触させて培養した場合とにおける、生成物の生成量または生成物の活性を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドの酵素活性を促進または阻害する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のペプチドを発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、前配と同様のものを用いることができる。

15 酵素活性は公知の方法を用いて測定することができる。

例えば、上記(ii)の場合における酵素活性が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のペプチドの酵素活性を促進する化合物として、上記(ii)の場合における酵素活性が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少させる試験化合物を本発明のペプチドの酵素活性を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のペプチドの酵素活性を促進する活性を有する化合物は、本発明のペプチドの作用を増強することができるので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

25 逆に、本発明のペプチドの酵素活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のペプチドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、

合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、 懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまた は温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、 10 トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ル ートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のペプチドの酵素活性を促進す る化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kg当たり)において は、一日につき該化合物を約 $0.1\sim100$ mg、好ましくは約 $1.0\sim50$ m 15 g、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、 該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、 本発明のペプチドの酵素活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人 (60 kg当たり)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程 度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg 20 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60k g当たりに換算した量を投与することができる。

(2-4) 本発明のペプチドの転写因子活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

25 本発明のペプチドまたは本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のペプチド の転写因子活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法に使用する ことができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明のペプチドが結合するDNA配列 (例、プロモーター領域、エン

ハンサー領域)の下流に選択マーカー遺伝子を結合させたDNAを含むベクターで形質転換された形質転換体を、本発明のペプチドの存在下で培養した場合と本発明のペプチドおよび試験化合物の存在下で培養した場合における、それぞれの選択マーカー活性を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドの転写因子活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法を提供する。

選択マーカー遺伝子としては、前記のレポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子が 用いられる(新生化学実験講座2、核酸III、3.6動物細胞発現ベクター、p84-103)。 薬剤耐性遺伝子と薬剤の組み合わせとしては、

- 10 (1) ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子とピューロマイシンとの組み合わせ、
 - (2) アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (APH) と G418 との 組み合わせ、
- (3) ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (HPH) とハイグロマイシン B との組み合わせ、
 - (4) キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPRT) とマイコフェノール酸との組み合わせ、などを用いることができる。

また、親株の細胞株がヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェ ラーゼ (HGPRT) またはチミジンキナーゼ (TK) 欠損株である場合、これらの遺 伝子と HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) との組み合わせを用 いることができる。

20

25

さらに、選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸還元酵素やアンピシリン耐性遺伝子などを用いることもできる。

これらの第一および第二の組換え遺伝子構築物を含有するベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、その他の選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを付加させても良い。

試験化合物としては、前記と同様のものを用いることができる。 レポーター活性は公知の方法を用いて測定することができる。 例えば、上記(ii)の場合におけるレポーター活性が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のペプチドの転写因子活性を促進する化合物として、上記(ii)の場合におけるレポーター活性が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少させる試験化合物を本発明のペプチドの転写因子活性を阻害する化合物として選択することができる。

5

10

15

20

25

本発明のペプチドの転写因子活性を促進する活性を有する化合物は、本発明のペプチドの作用を増強することができるので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、本発明のペプチドの転写因子活性を阻害する活性を有する化合物は、 本発明のペプチドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用 である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のペプチドの転写因子活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kg当たり)にお

いては、一日につき該化合物を約 $0.1\sim100$ mg、好ましくは約 $1.0\sim5$ 0mg、より好ましくは約 $1.0\sim20$ mg、投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のペプチドの転写因子活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kg当たり)に投与する場合、一日につき該化合物を約 $0.01\sim30$ mg程度、好ましくは約 $0.1\sim20$ mg程度、より好ましくは約 $0.1\sim20$ mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(2-5) 本発明のペプチドのタンパク質結合活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明のペプチド、本発明のオリゴヌクレオチドまたは本発明の形質転換体は、本発明のペプチドのタンパク質結合活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法に使用することができる。

すなわち、本発明は、

10

(i)本発明のペプチドまたはそれを含有する細胞と、本発明のペプチドが結合するタンパク質またはそれを含有する細胞とを、試験化合物の存在下および非存在下で接触させた場合における、それぞれの①両者の結合活性を測定するか、または②両細胞の形態変化を観察、比較することを特徴とする本発明のペプチドのタンパク質結合活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のペプチドを含有する細胞は、前記した本発明の形質転換体を用いることができる。

本発明のペプチドが結合するタンパク質またはそれを含有する細胞も同様にして製造することができる。

25 試験化合物としては、前記と同様のものを用いることができる。

両者の結合活性は公知の方法を用いて測定することができる。

両細胞の形態変化は公知の方法を用いて観察すことができる。

例えば、上記のスクリーニング方法において、タンパク質結合活性を約20% 以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化 合物を本発明のペプチドのタンパク質結合活性を促進する化合物として、逆に タンパク質結合活性を約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは 約50%以上減少させる試験化合物を本発明のペプチドのタンパク質結合活性 を阻害する化合物として選択することができる。

5 本発明のペプチドのタンパク質結合活性を促進する活性を有する化合物は、 本発明のペプチドの作用を増強することができるので、本発明のペプチドと同 様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、本発明のペプチドのタンパク質結合活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のペプチドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

10

15

20

25

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、 懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のペプチドのタンパク質結合活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kg当たり)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なる

が、例えば、本発明のペプチドのタンパク質結合活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kg当たり)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(3) 本発明のペプチドの定量

本発明の抗体は、本発明のペプチドを特異的に認識することができるので、 被検液中の本発明のペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量 などに使用することができる。

10 すなわち、本発明は、

20

25

- (i) 本発明の抗体と、被検液および標職化された本発明のペプチドとを競合 的に反応させ、該抗体に結合した標職化された本発明のペプチドの割合を測定 することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法、および
- (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の 15 別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の 活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法を提供 する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のペプチドのN端部を 認識する抗体で、他方の抗体が本発明のペプチドのC端部に反応する抗体であ ることが望ましい。

また、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のペプチドの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')。、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のペプチドの定量法は、 特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、ペプチド量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、

イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔125 I〕、〔131 I〕、〔3 H〕、〔14 C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、βーガラクトシダーゼ、βーグルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチンーアビジン系を用いることもできる。

5

10

15

20

25

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のペプチドの測定法においては、1次 反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のペプチ ドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応

15

20

25

および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、 本発明のペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好 ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B,Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化 抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中 の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標 識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの 相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の 沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメト リーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、 入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄 治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol.

73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal

10 Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のペプチド を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のペプチドの濃度を定量することによって、本発明のペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、本発明のペプチドの機能不全に関連する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

15

25

また、本発明のペプチドの濃度の増加が検出された場合には、例えば、本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- 20 本発明のペプチドF、G、HまたはIの機能不全に関連する疾患または過剰 発現に起因する疾患としては、例えば、
 - (i) 中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)、
 - (ii) プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全、

- (iii) プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ(Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト(Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常、
- (iv) 絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発、
- (v) 高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性パクテリア髄膜 炎, 急性心筋梗塞, 急性膵炎, 急性ウイルス脳炎, 成人呼吸促迫症候群, アル 10 コール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バク テリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部 がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん (結腸/直腸がん), クローン病, 痴呆, 糖尿病性合併症, 糖尿病性腎症, 糖 尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝 15 不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、 水痘帯状疱疹ウイルス感染症,ホジキン病,エイズ感染症,ヒトパピローマウ イルス感染症, 高カルシウム血症, 高コレステロール血症, 高グリセリド血症, 高脂血症, 感染症, インフルエンザ感染症, インシュリン依存性糖尿病(I型), 侵襲性ブドウ状球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギ 20 ー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型), 非小細胞肺がん,臓器移植,骨関節炎,骨軟化症,骨減少症,骨粗鬆症,卵巣 がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食 道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症 全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサ 25 ス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性/多発梗塞痴呆、創傷治癒、 不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾 患、
 - (vi) MACULAR EDEMA CYSTOID (囊胞状黄斑浮腫)、

- (vii) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイド、
- 5 (viii) インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)、
 - (ix) 高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症、
- (x) 急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃 10 炎、胃酸過多症、逆流性食道炎、
 - (xi) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状(例、ガストリン分泌 昂進など)、
 - (xii) 内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制、
- (xiii) 小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因する下 痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因 する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌 腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移 植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経養遮断に起因する 下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢、
- 20 (xiv) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、
 - (xv) 腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、 非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、 骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌 など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨 髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)、
 - (xvi) 肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成、
 - (xvii)食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患、
 - (xviii)全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマ

チ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚 炎、アレルギー性鼻炎など)など)、

(xix) 痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・ 多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、 多発性硬化症、

(xx) 眼疾患(例、緑内障など)、

5

10

20

(xxi) 急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しよう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎、

(xxii) 臟器移植、火傷、創傷、脱毛症、

15 (xxiii) 慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、 関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)、

(xxiv) 痛み、などが挙げられる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のペプチドの検出、被検細胞内における本発明のペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

(4)遺伝子診断剤

20

NAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics),第5巻,874~879頁(1989年)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第86巻,2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合 10 は、例えば、本発明のペプチドの機能不全に関連する疾患である可能性が高い または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合は、 例えば、本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患である可能性が高いまた は将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- 15 本発明のペプチドF、G、HまたはIの発現低下または過剰発現に起因する 疾患としては、例えば、
 - (i) 中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)、
 - (ii) プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、 精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不 全、
- 25 (iii) プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アルゴンツーデル・カスティロ(Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト(Forbes-Albright) 症候群、乳

癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常、

- (iv) 絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発、
- (v) 髙血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜 炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アル コール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バク テリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部 がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん (結腸/直腸がん), クローン病, 痴呆, 糖尿病性合併症, 糖尿病性腎症, 糖 尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝 10 不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、 水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウ イルス感染症, 高カルシウム血症, 高コレステロール血症, 高グリセリド血症, 高脂血症, 感染症、インフルエンザ感染症, インシュリン依存性糖尿病 (I型), 侵襲性ブドウ状球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギ 15 ー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型), 非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣 がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食 道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症 全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサ 20 ス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性/多発梗塞痴呆、創傷治癒、 不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾 患、
 - (vi) MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)、
- 25 (vii) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイド、
 - (viii) インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関

連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)、

- (ix) 高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症、
- (x) 急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎、
- (xi) ヘリコパクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状(例、ガストリン分泌 昂進など)、
- (xii) 内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制、
- (xiii) 小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因する下 痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因 する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌 腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移 植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経養遮断に起因する 下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢、
- 15 (xiv) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、
 - (xv) 腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、 非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、 骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌 など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨 髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)、
 - (xvi) 肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成、
 - (xvii) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患、

- - (xix) 痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・ 多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、 多発性硬化症、

- (xx) 眼疾患(例、緑内障など)、
- (xxi) 急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎、
 - (xxii) 臟器移植、火傷、創傷、脱毛症、
- 10 (xxiii) 慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、 関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)、
 - (xxiv) 痛み、などが挙げられる。
 - (5) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド(例、DNA)の発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のレセプター蛋白質または本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)の機能を抑制することができるので、例えば、本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患の予防・治療剤として用いることができる。

20 具体的には、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のペプチドF、G、HまたはIの機能を阻害することができるので、本発明のペプチドF、G、HまたはIの活性を抑制する安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌阻害剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、常覚調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤、本発明のペプチドF、G、HまたはIの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防・治療剤などとして有用である。

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドはプロラクチン分泌の調節剤として有用である。すなわち、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドがプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

5

10

15

25

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対する アンチセンスポリヌクレオチドがプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、 プロラクチン分泌促進作用に基づく性欲促進作用(フェロモン的作用)を有す るため、性欲促進剤としても有用である。

本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドがプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アルゴンツーデル・カスティロ(Argonz-del Castilo)症候群、フォーベス・アルブライト

20 (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドがプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

その他、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対する アンチセンスポリヌクレオチは、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬 としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの 動物薬としても有用であり、さらには該哺乳動物体内で有用物質を生産させ、 これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用できる。 さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対する アンチセンスポリヌクレオチは、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の 発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬とし ても有用である。

5

10

15

20

25

また、本発明のペプチドF、G、Hまたは I をコードするDNAに対するア ンチセンスポリヌクレオチは、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内 障、緑内障、急性パクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス 脳炎,成人呼吸促迫症候群,アルコール性肝炎,アルツハイマー病、喘息、動 脈硬化,アトピー性皮膚炎,バクテリア肺炎,膀胱がん,骨折,乳がん,過食 症,多食症,火傷治癒,子宮頸部がん,慢性リンパ性白血病,慢性骨髄性白血 病,慢性膵炎,肝硬変,大腸がん(結腸/直腸がん),クローン病,痴呆,糖 尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、へ リコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、 単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エ イズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステ ロール血症, 高グリセリド血症, 高脂血症, 感染症, インフルエンザ感染症, インシュリン依存性糖尿病(I型),侵襲性ブドウ状球菌感染症,悪性黒色腫, がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、 インシュリン非依存性糖尿病 (II 型), 非小細胞肺がん, 臓器移植, 骨関節炎, 骨軟化症,骨減少症,骨粗鬆症,卵巣がん,骨ペーチェット病,消化性潰瘍, 末梢血管疾患,前立腺がん,逆流性食道炎,腎不全,リウマチ関節炎,精神分 裂症,敗血症,敗血症ショック,重症全身性真菌感染症,小細胞肺がん,脊髄 損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、 血管性/多発梗塞痴呆, 創傷治癒, 不眠症, 関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、 瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として 有用できる。

また、本発明のペプチドF、G、Hまたは I をコードするDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチは、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対する アンチセンスポリヌクレオチは、例えば、(1)先端巨大症、TSH産生腫瘍、 非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピ ン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガスト 5 リン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、 (2) イ ンスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々 の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病 性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)の治療薬、(3)高インス リン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、(4) 急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、 10 胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、(5)ヘリコバクター・ピロリ菌感 染に伴う様々な症状の改善剤(例、ガストリン分泌昂進の抑制剤など)、(6) 内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の 予後治療薬、(7)小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に 起因する下痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの 15 薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの 神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴 う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断 に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢 などの治療薬、(8) ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性 20 腸疾患などの治療薬、(9)腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前 立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、 卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳 腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リ ンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など) 25 などの治療薬;該治療薬は、単独または他の制癌剤(例、タモキシフエン、L HRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロン $-\alpha$ 、 β およ 肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成

術後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、(11)食道静脈癌出血、肝 硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12)免疫系に作用する生理活性物質(例、 サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど) の分泌の調節作用に基づき、 例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマ チ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚 炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13)神経調節因子の産生・ 分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アル ツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、 うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14)眼疾 患(例、緑内障など)などの治療薬、(15)急性バクテリア髄膜炎、急性ウ イルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、 結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝 炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエ ンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ベーチェッ ト症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、髙カルシウム血症、髙コレス テロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過 性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(1 6) 臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17) 慢 性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、 リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤として も有用である。

10

15

20

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該アンチセンスポリヌクレオチドを、上記した本発明のポリヌクレオチドの場合と同様にして製剤化することができる。

25 このようにして得られる製剤は低毒性であり、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。

なお、該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進 用の補助剤などの生理学的に認められる担体とともに、遺伝子銃やハイドロゲ ルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、癌の治療の目的で本発明のアンチセンスヌクレオチドを臓器(例、肝臓、肺、心臓、腎臓など)に局所投与する場合、成人(体重60kg)に対して、一日あたり約0.1~100mgである。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明の DNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプロー プとして使用することもできる。

本発明は、さらに

- 10 ①本発明のペプチドをコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAとを含 有する二重鎖RNA、
 - ②前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
 - ③本発明のペプチドをコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
 - ④前記リボザイムを含有してなる医薬を提供する。
- これらの二重鎖RNA (RNAi; RNA interference 法)、リボザイムなどは、上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のポリヌクレオチド (例、DNA) の発現を抑制することができ、生体内における本発明のペプチド、G、HまたはIまたはそれをコードする本発明のポリヌクレオチド (例、DNA) の機能を抑制することができるので、例えば、本発明のペプチド、G、HまたはIの過剰発現に起因する疾患 (例えば、本発明のペプチド下、G、HまたはIの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患 (例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患)の予防・治療剤、ホルモン分泌調節剤 (例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌阻害剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節
 和、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤として用いることができる。

さらには、該二重鎖RNA (RNAi; RNA interference 法) またはリボザイムはプロラクチン分泌の調節作用剤として有用である。すなわち、該二重鎖RNA (RNAi; RNA interference 法) またはリボザイムがプロラクチン分泌促進作

用を有する場合は、プロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌不全に 関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年 期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関 係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、該二重鎖RN A (RNAi; RNA interference 法) またはリボザイムがプロラクチン分泌促進作 用を有する場合は、プロラクチン分泌促進作用に基づく性欲促進作用(フェロ モン的作用)を有するため、性欲促進剤としても有用である。

該二重鎖RNA(RNAi; RNA interference 法)またはリボザイムがプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アルゴンツーデル・カスティロ(Argonz-del Castilo)症候群、フォーベス・アルブライト(Forbes-Albright)症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、該二重鎖RNA(RNAi; RNA interference 法)またはリボザイムがプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

10

15

25

20 その他、該二重鎖RNA (RNAi; RNA interference 法) またはリボザイムは、 プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブ タなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、 さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分 泌することによる有用物質生産などへの応用できる。

さらに、該二重鎖RNA(RNAi; RNA interference 法)またはリボザイムは、 絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝 異常または分娩誘発の予防または治療薬としても有用である。

また、該二重鎖RNA (RNAi; RNA interference 法) またはリボザイムは、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性パクテリア髄

膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、ア ルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バ クテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸 部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸が ん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、 糖尿病性神経障害,糖尿病性網膜症,胃炎,ヘリコバクター・ピロリ感染症, 肝不全,A型肝炎,B型肝炎,C型肝炎,肝炎,単純ヘルペスウイルス感染症, 水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウ イルス感染症, 高カルシウム血症, 高コレステロール血症, 高グリセリド血症, 高脂血症, 感染症, インフルエンザ感染症, インシュリン依存性糖尿病(I型), 10 侵襲性ブドウ状球菌感染症,悪性黒色腫,がん転移,多発性骨髄腫,アレルギ 一性鼻炎, 腎炎, 非ホジキン性リンパ腫, インシュリン非依存性糖尿病 (II 型), 非小細胞肺がん,臓器移植,骨関節炎,骨軟化症,骨減少症,骨粗鬆症,卵巣 がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食 道炎,腎不全,リウマチ関節炎,精神分裂症,敗血症,敗血症ショック、重症 15 全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサ ス, 一過性脳虚血発作, 結核, 心弁膜症, 血管性/多発梗塞痴呆, 創傷治癒, 不眠症,関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾 患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として有用できる。

20 また、該二重鎖RNA (RNAi; RNA interference 法) またはリボザイムは、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫) の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、該二重鎖RNA (RNAi; RNA interference 法) またはリボザイムは、例えば、(1)先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH (アドレノコルチコトロピン) 産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、(2)インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低

15

20

25

血圧症など)の治療薬、(3)高インスリン血症の改善または食欲の抑制など による肥満、過食症などの治療薬、(4)急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィ ステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治 療薬、(5) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤(例、 ガストリン分泌昂進の抑制剤など)、(6)内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラ ーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、(7)小腸の吸収能 低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因する下痢(例、Short b owel症候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎 縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、A IDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、 糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因 する下痢、好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、 (8) ダンピング症候 群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、(9)腫瘍また は癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、 膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨 肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血 病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、 ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬;該治療薬は、単独ま たは他の制癌剤(例、タモキシフエン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタ ゴニスト、インターフェロン $-\alpha$ 、βおよび γ 、インターロイキン-2など) と併用して用いることができる、(10)肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜 症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成の予 防・治療薬、(11)食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(1 2) 免疫系に作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイ トカインなど)の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎 症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿 疹、アレルギー (例、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など) など) の治療薬、(13)神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例え ば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・

多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14)眼疾患(例、緑内障など)などの治療薬、(15)急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16)臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17)慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

二重鎖RNAは、公知の方法(例、Nature, 411 巻, 494 頁, 2001 年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法(例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221 頁, 2001年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のペプチドをコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分(RNA断片)が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

25 (6) 本発明の抗体を含有する医薬

10

15

20

本発明のペプチドの活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、 本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患などの予防・治療薬などの医薬と して使用することができる。

具体的には、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体は、本発明

のペプチドFの機能を阻害することができるので、本発明のペプチドF、G、 HまたはIの活性を抑制する安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節 剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌阻害剤)、摂食調 節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動 調節剤、情動行動調節剤、本発明のペプチドF、G、HまたはIの過剰な産生 によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例 えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防・治療剤など として有用である。

5

10

15

20

25

また、本発明のペプチドFに対する抗体は、プロラクチン分泌の調節作用剤として有用である。すなわち、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進作用に基づく性欲促進作用(フェロモン的作用)を有するため、性欲促進剤としても有用である。

本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アルゴンツーデル・カスティロ(Argonz-del Castilo)症候群、フォーベス・アルブライト(Forbes-Albright)症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

その他、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体は、プロラクチ

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

ン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用できる。

5 さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体は、胎盤機能調 節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、 糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬としても有用で ある。

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体は、例えば、高血 10 圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心 筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝 炎,アルツハイマー病,喘息,動脈硬化,アトピー性皮膚炎,バクテリア肺炎, 膀胱がん,骨折,乳がん,過食症,多食症,火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リ ンパ性白血病,慢性骨髄性白血病,慢性膵炎,肝硬変,大腸がん(結腸/直腸 がん), クローン病, 痴呆, 糖尿病性合併症, 糖尿病性腎症, 糖尿病性神経障 15 害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝 炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹 ウイルス感染症, ホジキン病, エイズ感染症, ヒトパピローマウイルス感染症, 高カルシウム血症,高コレステロール血症,高グリセリド血症,高脂血症,感 染症,インフルエンザ感染症,インシュリン依存性糖尿病(I型),侵襲性ブ 20 ドウ状球菌感染症,悪性黒色腫,がん転移,多発性骨髄腫,アレルギー性鼻炎, 腎炎,非ホジキン性リンパ腫,インシュリン非依存性糖尿病(II 型),非小細 胞肺がん,臓器移植,骨関節炎,骨軟化症,骨減少症,骨粗鬆症,卵巣がん, 骨ペーチェット病,消化性潰瘍,末梢血管疾患,前立腺がん,逆流性食道炎, 腎不全,リウマチ関節炎,精神分裂症,敗血症,敗血症ショック,重症全身性 25 真菌感染症,小細胞肺がん,脊髄損傷,胃がん,全身性エリテマトーサス,一 過性脳虚血発作,結核、心弁膜症、血管性/多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、 関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾 病の治療・予防剤などの医薬として有用できる。

10

15

20

25

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体は、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIに対する抗体は、例えば、(1) 先端巨大症、TSH產生腫瘍、非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性AC TH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、 グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドな どの腫瘍の治療薬、(2)インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいは これら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網 膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など) の治療薬、(3)高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、 過食症などの治療薬、(4)急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血 性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、(5) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤(例、ガストリン分 | 泌昂進の抑制剤など) 、(6) 内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑 制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、(7)小腸の吸収能低下、分泌昂 進または消化管の運動能異常に起因する下痢(例、Short bowel症 候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因す る下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起 因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に 起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、 好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、(8)ダンピング症候群、過敏性 大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、(9)腫瘍または癌(例、 甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃 癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性 褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好 塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、 非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬;該治療薬は、単独または他の制癌 剤(例、タモキシフエン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、イ

ンターフェロン $-\alpha$ 、 β および γ 、インターロイキン-2など)と併用して用 いることができる、(10)肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞 (特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、 (11)食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12)免疫系に 作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど) 5 の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、 多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、 喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13) 神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、ア 10 ルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、 精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症など の治療薬、(14)眼疾患(例、緑内障など)などの治療薬、(15)急性バ クテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、 重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性 肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイ 15 ルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗 しょう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カ ルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性 エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬 として有用であり、(16)臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などに 20 も用いられ、(17)慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯 痛、骨疾患(例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・ 緩和など、鎮痛剤としても有用である。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、 または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物 (例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して経口的または非 経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人に使用する場合には、本発明の 抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.

 $1\sim 10\,\mathrm{mg/kg}$ 体重程度、さらに好ましくは $0.1\sim 5\,\mathrm{mg/kg}$ 体重程度を、 $1\,\mathrm{H}\,1\sim 5\,\mathrm{DH2E}$ 、好ましくは $1\,\mathrm{H}\,1\sim 3\,\mathrm{DH2E}$ 、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

5

10

15

20

25

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤 形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒 剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁 剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤 分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものであ る。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステア リン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50(polyoxyethylene(50 mol)adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通

常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5~500mg、とりわけ注射剤では5~100mg、その他の剤形では10~250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を 生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

10 (7) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のペプチドをコードするDNA(以下、本発明の外来性DNAと略記する)またはその変異DNA(本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 15 (i) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
 - (ii) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(i) 記載の動物、
 - (iii) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第 (ii) 記載の動物、および
 - (iv) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。
- 20 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物(以下、本発明のDNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公

知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス(例えば、純系として、C57BL/6系統,DBA2系統など、交雑系として、 $B6C3F_1$ 系統, BDF_1 系統, $B6D2F_1$ 系統,BALB/c系統,ICR系統など)またはラット(例えば、Wistar, SDなど)などが好ましい。

10 哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、 上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異(例えば、突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

15

20

25

該異常DNAとしては、異常な本発明のペプチドを発現させるDNAを意味 し、例えば、正常な本発明のペプチドの機能を抑制するペプチドを発現させる DNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト(例、ベクターなど)を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出すること

ができる。

5

本発明のペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草 菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオフ アージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルス またはバキュロウィルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大 腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミド などが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス (例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、 JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来するDNAのプロ 10 モーター、②各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムス ター、ラット、マウスなど)由来のプロモーター、例えば、アルブミン、イン スリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセ リン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS ートランスフェラーゼ、血小板由来成長因子B、ケラチンK1, K10および 15 K14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キ ナーゼβΙサプユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファ ターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般 にTie2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(N a、K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIお 20 よびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原 (H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペル・ オキシダーゼ (TPO)、ペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、 チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VNP)、血清 25 アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチ ン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用い られる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロ モーター、ヒトペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α) のプロモーター、ヒト

5

10

15

25

およびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列(一般にターミネターと呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流 に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前 20 記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通 常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来

性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

5

15

20

25

10 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように 繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発 現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に 本発明のペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物と して利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、 本発明のペプチドの機能亢進症や、本発明のペプチドが関連する疾患の病態機 序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のペプチドの増加症状を有することから、本発明のペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原科として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子

5

10

15

20

25

孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ペプチドによる正常ペプチドの機能阻害(dominant negative 作用)を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のペプチドの増加症状を有することから、本発明のペプチドまたはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、 例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

5

10

15

⑤本発明の変異ペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

- (8) ノックアウト動物
- 20 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (i) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (ii) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の β ガラクトシダーゼ 25 遺伝子)を導入することにより不活性化された第(i)項記載の胚幹細胞、
 - (iii) ネオマイシン耐性である第(i) 項記載の胚幹細胞、
 - (iv) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(i) 項記載の胚幹細胞、
 - (v) ゲッ歯動物がマウスである第(iv) 項記載の胚幹細胞、
 - (vi) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、

- (vii) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の β ガラクトシダーゼ 遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第 (vi) 項記載の非ヒト哺乳動物、
- 5 (viii) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(vi) 項記載の非ヒト哺乳動物、
 - (ix) ゲッ歯動物がマウスである第 (viii) 項記載の非ヒト哺乳動物、および
 - (x) 第(vii) 項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のペプチドの発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

20

25

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいは1acZ(βーガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結さ

せるDNA配列(例えば、poly A付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

5

25

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞と 10 しては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufma の方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウス のES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、 免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝 的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マ 15 ウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善した BDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したもの なども良好に用いうる。BDF╷マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であ るという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用い て得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウ 20 スとパッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代える ことが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の

性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

5

10

15

20

25

また、第二次セレクションとしては、例えば、Gーバンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1~10000 U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または 細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋など の種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー(Nature)第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメ ンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。

5 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法 を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別 することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

15 本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその 近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析または ターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使 用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細 20 胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8 細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。こ

のようにして得られた個体は、通常、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション 法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に 導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトラ ンスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のD NA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

5

15

20

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、 該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNA を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザ イゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1,ホモザイゴート複数になる ような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴー ト動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴート およびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のペプチドにより 誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のペプチドの生物活性の 不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明 及び治療法の検討に有用である。

25 (8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防 効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物 を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNA の欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物また はその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺 5 乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

10

25

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿な どがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物 であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理 し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変 化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注 射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選 15 択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質 などにあわせて適宜選択することができる。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該 試験動物の機能が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約 20 50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果 を有する化合物として選択することができる。

具体的には、本発明のペプチドが、本発明のペプチドF、G、HまたはIで ある場合、該化合物を例えば、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調 節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤、または中枢疾 患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホル モン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、 帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば 糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循

10

25

環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)の予防・治療剤などと して使用することができる。

また、核化合物はプロラクチン分泌の調節作用剤として有用である。すなわち、核化合物がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、核化合物がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進作用に基づく性欲促進作用(フェロモン的作用)を有するため、性欲促進剤としても有用である。

該化合物がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、

15 キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルプライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、 該化合物がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制 作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

その他、該化合物は、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、 また、ウシ、ヤギ、プタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬 としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、こ れをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用できる。

さらに、該化合物は、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、 糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬としても有用で ある。

また、該化合物は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成

人呼吸促迫症侯群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、 アトピー性皮膚炎,バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食 症,火傷治癒,子宮頸部がん,慢性リンパ性白血病,慢性骨髄性白血病,慢性 膵炎,肝硬変,大腸がん(結腸/直腸がん),クローン病,痴呆,糖尿病性合 併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバク ター・ピロリ感染症,肝不全,A型肝炎,B型肝炎,C型肝炎,肝炎,単純へ ルペスウイルス感染症,水痘帯状疱疹ウイルス感染症,ホジキン病,エイズ感 染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール 血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシ ュリン依存性糖尿病 (I型),侵襲性プドウ状球菌感染症,悪性黒色腫,がん 10 転移,多発性骨髄腫,アレルギー性鼻炎,腎炎,非ホジキン性リンパ腫,イン シュリン非依存性糖尿病(II 型),非小細胞肺がん,臓器移植,骨関節炎,骨 軟化症,骨減少症,骨粗鬆症,卵巣がん,骨ペーチェット病,消化性潰瘍,末 梢血管疾患,前立腺がん,逆流性食道炎,腎不全,リウマチ関節炎,精神分裂 症, 敗血症, 敗血症ショック, 重症全身性真菌感染症, 小細胞肺がん, 脊髄損 15 傷,胃がん,全身性エリテマトーサス,一過性脳虚血発作,結核,心弁膜症, 血管性/多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、 瀬尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として 有用できる。

20 また、該化合物は、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)の疾病の治療・ 予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、該化合物は、例えば、(1)先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性ACTH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドなどの腫瘍の治療薬、(2)インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいはこれら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など)の治療薬、(3)高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、過食症などの治療薬、(4)急性膵

25

5

10

15

20

25

炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過 多症、逆流性食道炎などの治療薬、(5)ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴 う様々な症状の改善剤(例、ガストリン分泌昂進の抑制剤など)、(6)内視 鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑制剤、さらには膵臓外科手術の予後 治療薬、(7)小腸の吸収能低下、分泌昂進または消化管の運動能異常に起因 する下痢(例、Short bowel症候群など)、癌化学療法などの薬物 に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因する下痢、VIP産生腫瘍などの神経 内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起因する下痢、骨髄移植などに伴う対 宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起 因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、好酸球増加症に起因する下痢など の治療薬、(8)ダンピング症候群、過敏性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾 患などの治療薬、(9)腫瘍または癌(例、甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺 癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵 巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫 瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好塩基性白血球の白血病・慢性リン パ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキン性リンパ腫など)な どの治療薬;該治療薬は、単独または他の制癌剤(例、タモキシフエン、LH RHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、インターフェロンー α 、 β および y、インターロイキンー2など)と併用して用いることができる、(10)肥 大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞(特に、経皮経管冠動脈形成術 後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、(11)食道静脈癌出血、肝硬 変、末梢血管疾患の治療薬、(12)免疫系に作用する生理活性物質(例、サ ブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)の分泌の調節作用に基づき、 例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、多発性動脈炎、リュウマ チ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、喘息、アトピー性皮膚 炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13)神経調節因子の産生・ 分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、アルツハイマー病、アル ツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、精神分裂症、てんかん、 うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症などの治療薬、(14)眼疾

患(例、緑内障など)などの治療薬、(15)急性バクテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗しょう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬として有用であり、(16)臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などにも用いられ、(17)慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯痛、骨疾患(例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・緩和など、鎮痛剤としても有用である。

5

10

15

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から 選ばれた化合物であり、本発明のペプチドの欠損や損傷などによって引き起こ される疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒 性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スク リーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができ る。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸など)や塩基(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前 記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトま 10

15

20

たは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人患者(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人患者(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(8b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化 合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、 レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対する プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニン グ方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

25 レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、βーガラクトシ ダーゼ遺伝子(1 a c Z)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはル シフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非 ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーター の支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレー スすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

5

10

15

20

25

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した 試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター 活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、 本発明のペプチドの発現を促進し、該ペプチドの機能を促進することができる ので、例えば、本発明のペプチドの機能不全に関連する疾患などの予防・治療 5

10

15

20

25

剤などの医薬として有用である。

より具体的には、本発明のペプチドが、本発明のペプチドF、G、Hまたは I である場合、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤 (例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌調節剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤などとして有用である。

また、本発明のペプチドF、G、Hまたは I をコードするDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のペプチドFの活性を促進する安全で低毒性な医薬、例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)の予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌促進剤などとして有用である。

一方、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のペプチドFの活性を抑制する安全で低毒性な医薬、例えば、本発明のペプチドFの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌阻害剤などとして有用である。

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、プロラクチン分泌の調節作用剤として有用である。すなわち、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進剤として、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患、例えば、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機

能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌促進作用に基づく性欲促進作用(フェロモン的作用)を有するため、性欲促進剤としても有用である。

5

10

15

20

25

本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制剤として、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患、例えば、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル(Chiari-Frommel)症候群、アルゴンツーデル・カスティロ(Argonz-del Castilo)症候群、フォーベス・アルプライト(Forbes-Albright)症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩がプロラクチン分泌抑制作用を有する場合は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

その他、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対する プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、プロラクチン 分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの畜産 哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜 産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することに よる有用物質生産などへの応用できる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対する プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、絨毛癌、胞状 奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分 娩誘発の予防または治療薬としても有用である。 また、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎,急性心筋梗塞,急性膵炎,急性ウイルス脳炎,成人呼吸促迫症候群,アルコール性肝炎,

アルツハイマー病,喘息,動脈硬化,アトピー性皮膚炎,バクテリア肺炎,膀胱がん,骨折,乳がん,過食症,多食症,火傷治癒,子宮頸部がん,慢性リンパ性白血病,慢性骨髄性白血病,慢性膵炎,肝硬変,大腸がん(結腸/直腸がん),クローン病,痴呆,糖尿病性合併症,糖尿病性腎症,糖尿病性神経障害,糖尿病性網膜症,胃炎,ヘリコバクター・ピロリ感染症,肝不全,A型肝炎,

B型肝炎, C型肝炎, 肝炎, 単純ヘルペスウイルス感染症, 水痘帯状疱疹ウイルス感染症, ホジキン病, エイズ感染症, ヒトパピローマウイルス感染症, 高カルシウム血症, 高コレステロール血症, 高グリセリド血症, 高脂血症, 感染症, インフルエンザ感染症, インシュリン依存性糖尿病 (I型), 侵襲性ブドウ状球菌感染症, 悪性黒色腫, がん転移, 多発性骨髄腫, アレルギー性鼻炎,

10

25

15 腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病(II型)、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一 過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性/多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として有用できる。

また、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、MACULAR EDEMA CYSTOID (嚢胞状黄斑浮腫)の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、本発明のペプチドF、G、HまたはIをコードするDNAに対する プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、(1) 先端巨大症、TSH産生腫瘍、非分泌性(非機能性)下垂体腫瘍、異所性AC

TH(アドレノコルチコトロピン)産生腫瘍、髄様甲状腺癌、VIP産生腫瘍、 グルカゴン産生腫瘍、ガストリン産生腫瘍、インスリノーマ、カルチノイドな どの腫瘍の治療薬、(2)インスリン依存性または非依存性糖尿病、あるいは これら糖尿病に関連した種々の疾患、すなわち糖尿病合併症(例、糖尿病性網 5 膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、ドーン症候群、起立性低血圧症など) の治療薬、(3)高インスリン血症の改善または食欲の抑制などによる肥満、 過食症などの治療薬、(4)急性膵炎、慢性膵炎、膵臓・腸フィステル、出血 性潰瘍、消化性潰瘍、胃炎、胃酸過多症、逆流性食道炎などの治療薬、(5) ヘリコバクター・ピロリ菌感染に伴う様々な症状の改善剤(例、ガストリン分 10 泌昂進の抑制剤など)、(6)内視鏡胆道膵管造影に伴うアミラーゼの分泌抑 制剤、さらには膵臓外科手術の予後治療薬、(7)小腸の吸収能低下、分泌昂 進または消化管の運動能異常に起因する下痢(例、Short bowel症 候群など)、癌化学療法などの薬物に起因する下痢、先天性小腸萎縮に起因す る下痢、VIP産生腫瘍などの神経内分泌腫瘍に起因する下痢、AIDSに起 因する下痢、骨髄移植などに伴う対宿主移植片反応に起因する下痢、糖尿病に 15 起因する下痢、腹腔神経叢遮断に起因する下痢、全身性硬化症に起因する下痢、 好酸球増加症に起因する下痢などの治療薬、(8)ダンピング症候群、過敏性 大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患などの治療薬、(9)腫瘍または癌(例、 甲状腺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃 癌、胆管癌、肝臓癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、骨肉腫、軟骨肉腫、悪性 20 褐色細胞腫、神経芽細胞腫、脳腫瘍、胸腺腫、腎臓癌など)、白血病(例、好 塩基性白血球の白血病・慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、 非ホジキン性リンパ腫など)などの治療薬;該治療薬は、単独または他の制癌 剤(例、タモキシフエン、LHRHアゴニスト、LHRHアンタゴニスト、イ ンターフェロンーα、βおよ $U_γ$ 、インターロイキンー2など)と併用して用 25 いることができる、(10)肥大性心筋症、動脈硬化症、心弁膜症、心筋梗塞 (特に、経皮経管冠動脈形成術後の心解梗塞)、再血管形成の予防・治療薬、 (11) 食道静脈癌出血、肝硬変、末梢血管疾患の治療薬、(12) 免疫系に 作用する生理活性物質(例、サブスタンスP、タヒキニン、サイトカインなど)

の分泌の調節作用に基づき、例えば、全身性または局所性の炎症に伴う疾患(例、 多発性動脈炎、リュウマチ性関節炎、乾せん、日焼け、湿疹、アレルギー(例、 喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)など)の治療薬、(13) 神経調節因子の産生・分泌に影響を及ぼすことから、例えば、痴呆症(例、ア ルツハイマー病、アルツハイマー型老年期痴呆、血管性・多発性痴呆など)、 精神分裂症、てんかん、うつ病、一般不安障害、睡眠障害、多発性硬化症など の治療薬、(14) 眼疾患(例、緑内障など)などの治療薬、(15)急性バ クテリア髄膜炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、 重症全身性真菌感染症、結核、脊髄損傷、骨折、肝不全、肺炎、アルコール性 肝炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、AIDS感染症、ヒトパピローマウイ ルス感染症、インフルエンザ感染症、癌転移、多発性骨髄腫、骨軟化症、骨粗 しょう症、骨ベーチェット症、腎炎、腎不全、敗血症、敗血症ショック、高カ ルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、全身性 エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、アルコール性肝炎などの予防・治療薬 として有用であり、(16) 臓器移植、火傷、創傷、脱毛症などの治癒などに も用いられ、(17)慢性あるいは急性疼痛(例、術後疼痛、炎症性疼痛、歯 痛、骨疾患(例、関節炎、リウマチ、骨粗鬆症など)にともなう疼痛)の抑制・ 緩和など、鎮痛剤としても有用である。

10

15

25

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様 20 に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前 記した本発明のペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造するこ とができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人患者(体重60kgとして)に

. . . .

おいては、一日につき該化合物を約 $0.1\sim100$ mg、好ましくは約 $1.0\sim50$ mg、より好ましくは約 $1.0\sim20$ mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人患者(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約 $0.01\sim30$ mg程度、好ましくは約 $0.1\sim20$ mg程度、より好ましくは約 $0.1\sim20$ mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

5

10

15

20

25

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人患者(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人患者(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物(遺伝子移入動物)を作成すれば、特異的にそのペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系と

して使用できる。

10

AQ27受容体に対する抗体、AQ27受容体をコードするDNAと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド(アンチセンスDNA)は、WO01/16313号に記載の方法に準じて製造することができる。

AQ27受容体、AQ27受容体をコードするDNA(以下、AQ27受容体DNAと略記する場合がある)、AQ27受容体に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)、AQ27受容体DNAに対するアンチセンスDNA(以下、本発明のアンチセンスDNAと略記する場合がある)は、以下の用途を有している。

- (1) AQ27受容体の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤 a) AQ27受容体またはb) AQ27受容体をコードするDNAを、AQ2 7受容体の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬と して使用することができる。
- 15 例えば、生体内においてAQ27受容体が減少しているために、リガンドである脂肪酸の生理作用が期待できない(AQ27受容体の欠乏症)患者がいる場合に、a)AQ27受容体を該患者に投与し該AQ27受容体の量を補充したり、b)(イ)AQ27受容体をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)対象となる細胞にAQ27受容体をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるAQ27受容体の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。すなわち、AQ27受容体をコードするDNAは、安全で低毒性なAQ27受容体の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などとして有用である。
- 25 具体的には、AQ27受容体またはAQ27受容体DNAは、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌促進剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤などとして有用である。

また、AQ27受容体またはAQ27受容体DNAは、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)の予防・治療剤などとして有用である。

5

15

20

AQ27受容体を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、AQ27受容体DNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、AQ27受容体DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。AQ27受容体DNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、a) AQ27受容体またはb) AQ27受容体DNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、a) AQ27受容体またはb) AQ27受容体DNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タ

イプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、Dーソルビトール、Dーマンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80[™]、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

5

10

15

20

25

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

AQ27受容体の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与

することができる。

AQ27受容体DNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(2) 遺伝子診断剤

10

15

AQ27受容体DNAおよびアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)におけるAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

AQ27受容体DNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics),第5巻,874~879頁(1989年)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第86巻,2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりAQ27受容体の発現低下が検出された場合は、例えば、AQ27受容体の機能不全に関連する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができ

る。

5

10

15

20

25

また、ノーザンハイブリダイゼーションによりAQ27受容体の発現過多が 検出された場合は、例えば、AQ27受容体の過剰発現に起因する疾患である 可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

AQ27受容体の機能不全に関連する疾患としては、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滯など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)などが挙げられる。

AQ27受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、AQ27受容体の過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患などが挙げられる。

(3) AQ27受容体の発現量を変化させる化合物を含有する医薬 AQ27受容体DNAは、プローブとして用いることにより、AQ27受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i)非ヒト哺乳動物の a)血液、b)特定の臓器、c)臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii)形質転換体等に含まれるAQ27受容体のmRNA量を測定することによる、AQ27受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

AQ27受容体のmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれるAQ27受容体のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノザンブロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) AQ27受容体を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該 形質転換体に含まれるAQ27受容体のmRNAを同様にして定量、解析する ことができる。

AQ27受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

5

20

25

- (i)正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理 10 的ストレスなどを与える一定時間前(30分前~24時間前、好ましくは30 分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前)もしくは一定時間後 (30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後 ~24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投 与し、投与後一定時間経過後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日 後、より好ましくは1時間後~24時間後)、細胞に含まれるAQ27受容体 のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、
 - (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、 一定時間培養後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましく は2日後~3日後)、該形質転換体に含まれるAQ27受容体のmRNA量を 定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、AQ27受容体の発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、

- (イ) AQ27受容体の発現量を増加させることにより、AQ27受容体を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca² + 遊離、細胞内 c AMP生成、細胞内 c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、
- (ロ) AQ27受容体の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記スクリーニング方法で得られるAQ27受容体の発現量を変化させる化 合物は、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチ コステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌調節剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、 覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調 節剤などとして有用である。

また、AQ27受容体の発現量を増加させ、細胞刺激活性を増強させる化合物は、AQ27受容体の機能不全に関連する疾患、例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)に対する安全で低毒性な予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌促進剤などとして有用である。

10

15

20

25

AQ27受容体の発現量を減少させ、細胞刺激活性を減弱させる化合物は、AQ27受容体の発現過多に起因する疾患、例えば、AQ27受容体の過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌阻害剤などとして有用である。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造す

ることができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容 量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼ ラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性 セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのよ 5 うな膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖または サッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのよう な香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タ イプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のた めの無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油な どのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施 に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩 水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、Dーソルビトール、D ーマンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、 例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレング

10

15 リコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソル ベート80[™]、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例 えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ペンジル、 ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢 20 酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロ カインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコー ルなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防 止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填 される。 25

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺 乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、 サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法な

どにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

10 (4) AQ27受容体の定量法および診断方法

本発明の抗体は、AQ27受容体を特異的に認識することができるので、 被検液中のAQ27受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量 などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

5

20

- 15 (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化されたAQ27受容体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたAQ27受容体の割合を測定することを特徴とする被検液中のAQ27受容体の定量法、および
 - (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のAQ27受容体の定量法を提供する。
 - 上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体がAQ27受容体のN端部を認識する抗体で、他方の抗体がAQ27受容体のC端部に反応する抗体であることが望ましい。
- 25 また、AQ27受容体に対するモノクローナル抗体を用いてAQ27受容体の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')。、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いるAQ27受容体の定量法は、特に制限されるべきも

のではなく、被測定液中の抗原量(例えば、AQ27受容体量)に対応した 抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により 検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算 出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメ トリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いら れるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好 ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔125 I〕、〔131 I〕、〔3H〕、〔14 C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、βーガラクトシダーゼ、βーグルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチンーアビジン系を用いることもできる。

10

15

20

25

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常AQ27受容体あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検 液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル 抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定す ることにより被検液中のAQ27受容体量を定量することができる。1次反 応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間を ずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準 じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相 用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるAQ27受容体の測定法においては、1次 反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、AQ27受容 体の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反 応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体 が、AQ27受容体のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、 好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

5

10

15

20

25

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B,Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識 化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検 液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反 応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、い ずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果 生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少 量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフ ロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、

特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてAQ27受容体の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、 5 入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川 栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編 「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら 編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、 同書 Vol. 10 73(Immunochemical Techniques(Part B))、 同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、 同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D: Selected Immunoassays))、 同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、 同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and 15 Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行) などを参照する ことができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、AQ27受容体 を感度良く定量することができる。

20 さらには、本発明の抗体を用いてAQ27受容体の濃度を定量することによって、AQ27受容体の濃度の減少が検出された場合、例えば、AQ27 受容体の機能不全に関連する疾患である、または将来罹患する可能性が高い と診断することができる。

また、AQ27受容体の濃度の増加が検出された場合には、例えば、AQ 27 受容体の過剰発現に起因する疾患である、または将来罹患する可能性が 高いと診断することができる。

AQ27受容体の機能不全に関連する疾患としては、中枢疾患(例えばアルツ ハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例 えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工

20

25

妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)などが挙げられる。

AQ27受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、AQ27受容体の過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患などが挙げられる。

- (5) 細胞膜におけるAQ27受容体またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する医薬
- 10 本発明の抗体は、AQ27受容体を特異的に認識することができるので、細胞膜におけるAQ27受容体の量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

- (i) 非ヒト哺乳動物の a) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織 もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるA Q27受容体を定量することによる、細胞膜におけるAQ27受容体の量を変 化させる化合物のスクリーニング方法、
 - (ii) AQ27受容体を発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を 単離し、細胞膜画分に含まれるAQ27受容体を定量することによる、細胞膜 におけるAQ27受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
 - (iii) 非ヒト哺乳動物の a) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜におけるAQ27受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。
 - (iv) AQ27受容体を発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜におけるAQ27受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 218

5

10

15

20

25

細胞膜画分に含まれるAQ27受容体の定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液(例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など)等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤(例えば、トリトンX100TM、ツイーン20TMなど)などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、PotterーElvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し費す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica 社製)のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500 rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したAQ27受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれるAQ27受容体は、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンプロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができ、 ウエスタンプロットは自体公知の手段により行なうことができる。 10

15

20

25

(ii) AQ27受容体を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれるAQ27受容体を定量することができる。

細胞膜におけるAQ27受容体の量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前(30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前)もしくは一定時間後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、細胞膜におけるAQ27受容体の量を定量することにより行なうことができ、
- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、 一定時間培養後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましく は2日後~3日後)、細胞膜におけるAQ27受容体の量を定量することによ り行なうことができる。

細胞膜画分に含まれるAQ27受容体の確認は具体的には以下のようにして 行なう。

- (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜におけるAQ27受容体の量を確認することができる。
 - (iv) AQ27受容体を発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとるこ

とにより確認することもできる。

5

15

20

25

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜におけるAQ27受容体の量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)細胞膜におけるAQ27受容体の量を増加させることにより、 G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、

G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラギドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca² + 遊離、細胞内 cAMP生成、細胞内 cG MP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(ロ)細胞膜におけるAQ27受容体の量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

・ 該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発 酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公 知の化合物であってもよい。

該化合物は、安全で低審性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、 コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌調節剤)、摂食調節剤、睡眠調 節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動 行動調節剤などとして有用である。

また、細胞膜におけるAQ27受容体の量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物は、AQ27受容体の機能不全に関連する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌促進剤などとして有用である。

細胞膜におけるAQ27受容体の量を減少させることにより、細胞刺激活性 を減弱させる化合物は、AQ27受容体の発現過多に起因する疾患に対する安 全で低毒性な予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌阻害剤などとして有用であ る。

AQ27受容体の機能不全に関連する疾患としては、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害な

ど)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)などが挙げられる。

AQ27受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、AQ27受容体の過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患などが挙げられる。

5

10

15

20

25

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、プドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、Dーソルビトール、Dーマンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレング

リコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80[™]、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

5 また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(6) AQ27受容体に対する抗体を含有してなる医薬

15

20

25 AQ27受容体に対する抗体の中和活性とは、該AQ27受容体の関与する シグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性 を有する場合は、該AQ27受容体の関与するシグナル伝達、例えば、該AQ 27受容体を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリ ン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イ ノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、 c - f o s の活性化、 p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を不活性化することができる。

したがって、AQ27受容体に対する中和抗体は、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌阻害剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調、またはAQ27受容体の過剰発現などに起因する疾患、例えば、本発明のペプチドFの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防・治療剤などとして有用である。

(7) 本発明のアンチセンスDNAを含有してなる医薬

5

10

15

20

25

本発明のアンチセンスDNAは、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌阻害剤)、 摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、 自発行動調節剤、情動行動調、またはAQ27受容体の過剰発現などに起因 する疾患、例えば、本発明のペプチドFの過剰な産生によって惹起される中 枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂 食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防・治療剤などとして用いるこ とができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞におけるAQ27受容体DNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプロー

プとして使用することもできる。

(8) AQ27受容体DNA導入動物の作製

本発明は、外来性のAQ27受容体DNA(以下、本発明の外来性DNAと略記する)またはその変異DNA(本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

5

15

20

- [1]本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- [2] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第 [1] 記載の動物、
- [3] ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第[2]記載の動物、および
- 10 [4] 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物(以下、AQ27受容体DNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることによりAQ27受容体DNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、 25 イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。 なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが 比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス(例えば、純 系として、C57BL/6系統,DBA2系統など、交雑系として、B6C 3F1系統,BDF1系統,B6D2F1系統,BALB/c系統,ICR系統 など) またはラット (例えば、Wistar, SDなど) などが好ましい。 哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有しているAQ27受容体DNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出されたAQ27受容体DNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元のAQ27受容体DNAの塩基配列に変異 (例えば、突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

10

15

20

25

該異常DNAとしては、異常なAQ27受容体を発現させるDNAを意味 し、例えば、正常なAQ27受容体の機能を抑制するAQ27受容体を発現 させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。AQ27受容体DNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高いAQ27受容体DNAを有する各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト(例、ベクターなど)を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによってAQ27受容体DNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

AQ27受容体の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草 菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオ ファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィ ルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかで も、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプ ラスミドなどが好ましく用いられる。

ロモーターなどが好適である。

25

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイル ス(例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイル ス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど)に由来するDNA のプロモーター、②各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、 5 ハムスター、ラット、マウスなど)由来のプロモーター、例えば、アルブミ ン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、 エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グル タチオンSートランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依 10 存タンパク質キナーゼ B I サブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性ア ルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロ シンキナーゼ (一般にTie2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシ ン3リン酸化酵素(Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、 メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビタ 15 ー、MHCクラス I 抗原(H ー 2 L)、H ー r a s 、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ペプチド鎖延長因子1α $(EF-1\alpha)$ 、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1お よび2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロ ブリン、H鎖可変部(VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグ 20 ロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バ ソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現 することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長 因子 1 α (EF-1 α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプ

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャー RNAの転写を終結する配列(一般にターミネターと呼ばれる)を有してい ることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DN Aの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40タ WO 03/020932 PCT/JP02/08872

ーミネターなどが用いられる。

5

10

15

20

25

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常なAQ27受容体の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なAQ27受容体の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、 前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させ る通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の 胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転 移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在する WO 03/020932 PCT/JP02/08872 228

ことは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の 外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け 継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外 来性DNAを過剰に有する。

5 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この 雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するよ うに繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的にAQ27受容体の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、AQ27受容体の機能亢進症や、AQ27受容体が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

10

15

20

25

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離したAQ27受容体の増加症状を有することから、AQ27受容体に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により、外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原科として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、

この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的にAQ27受容体の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、AQ27受容体の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、 10 AQ27受容体の機能不活性型不応症における本発明の異常AQ27受容体 による正常AQ27受容体の機能阻害(dominant negative作用)を解明する モデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離したAQ2 7受容体の増加症状を有することから、AQ27受容体またはの機能不活性 型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類のAQ27受容体DNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

15

- ②AQ27受容体DNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分 20 析するか、またはDNAにより発現されたAQ27受容体組織を分析することによる、AQ27受容体により特異的に発現あるいは活性化するAQ27 受容体との関連性についての解析、
 - ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- 25 ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
 - ⑤本発明の変異AQ27受容体を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、AQ27受容体DNA転移動物を用いて、AQ27受容体の機能

不活性型不応症などを含む、AQ27受容体に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、AQ27受容体に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

5 また、AQ27受容体DNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、AQ27受容体産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、AQ27受容体およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、AQ27受容体DNA転移動物を用いて、AQ27受容体の機能不活性型不応症を含む、AQ27受容体に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、AQ27受容体DNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、AQ27受容体が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(9) ノックアウト動物

15

20 本発明は、AQ27受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞およびAQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- [1] AQ27受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- [2] 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のβーガラクトシダー25 ゼ遺伝子)を導入することにより不活性化された第[1]項記載の胚幹細胞、
 - [3] ネオマイシン耐性である第[1] 項記載の胚幹細胞、
 - [4] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕項記載の胚幹細胞、
 - [5] ゲッ歯動物がマウスである第[4] 項記載の胚幹細胞、
 - [6] AQ27受容体DNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳

動物、

5

10

15

25

[7] 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のβーガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子がAQ27受容体DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第[6]項記載の非ヒト哺乳動物、

- [8] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[6] 項記載の非ヒト哺乳動物、
- [9] ゲッ歯動物がマウスである第[8] 項記載の非ヒト哺乳動物、および [10] 第[7] 項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子 の発現を検出することを特徴とするAQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を 提供する。

AQ27受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有するAQ27受容体DNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしているAQ27受容体の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的にAQ27受容体の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前配と同様のものが用いられる。

20 AQ27受容体DNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

AQ27受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、AQ27受容体DNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有するAQ27受容体DNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるい

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

は1acZ(βーガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞についてAQ27受容体DNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用したAQ27受容体DNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

5

10

また、相同組換え法等によりAQ27受容体DNAを不活化させる元のE S細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、 15 また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例え ば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用 されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系 で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、 C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との 20 交雑により改善したBDF,マウス $(C57BL/62DBA/22E0F_1)$ を用いて樹立したものなども良好に用いうる。BDF,マウスは、採卵数が多 く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背 景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出し たとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景を 25 C57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が 生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減 するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

5

10

15

20

25

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による 染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は 正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1~10000U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋

などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られるAQ27受容体DNA発現不全細胞は、インビトロにおけるAQ27受容体またはAQ27受容体の細胞生物学的検討において有用である。

10 AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を 公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常 動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

15

20

25

AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターのAQ27受容体DNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上のAQ27受容体DNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、AQ27受容体DNAをノックアウトさせることができる。

AQ27受容体DNAがノックアウトされた細胞は、AQ27受容体DNA上またはその近傍のDNA配列をプロープとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来のAQ27受容体DNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、AQ27受容体DNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出

された動物は正常なAQ27受容体DNA座をもつ細胞と人為的に変異したAQ27受容体DNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異したAQ27受容体DNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えたAQ27受容体DNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、AQ27受容体のヘテロ発現不全個体であり、AQ27受容体のヘテロ発現不全個体であを交配し、それらの産仔からAQ27受容体のホモ発現不全個体を得ることができる。

10

15

20

25

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えによりAQ27受容体DNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにしてAQ27受容体DNAがノックアウトされている個体は、 交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確 認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1,ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

AQ27受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、AQ27受容体により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、AQ27受容体の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

5 (9a) AQ27受容体DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、AQ27受容体DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

10 すなわち、本発明は、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、AQ27受容体DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられるAQ27受容体DNA発現不全 非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

15

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿 などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化 合物であってもよい。

20 具体的には、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈 25 注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適 宜選択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性 質などにあわせて適宜選択することができる。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、

5

10

15

20

25

該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・ 予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から 選ばれた化合物であり、AQ27受容体の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患(例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滯など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等))に対する安全で低毒性な治療・予防剤、ホルモン分泌調節剤(例えば、副コルチコステロンなどの腎皮質ホルモン分泌促進剤)、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、情動行動調節剤などとして有用である。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸など)や塩基(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、 前記したAQ27受容体とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有す る医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒト または哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、 プタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に糖尿病患者(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常、糖尿病患者(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(9b) AQ27受容体DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするAQ27受容体DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記したAQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、AQ27受容体DNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子がAQ27受容体DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

10

15

20

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、βーガラクト 25 シダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子また はルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

AQ27受容体DNAをレポーター遺伝子で置換されたAQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子がAQ27受容体DNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコー

ドする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

10

15

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化 20 合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、 有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加 塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン 酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、 プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リン ゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との 塩などが用いられる。

AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、安全で低毒性な医薬、例えば、ホルモン分泌調節剤(例えば、コルチコステロンなどの副腎皮質ホルモン分泌調節剤)、摂食調節剤、睡

5

10

15

眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤、 情動行動調節剤などとして有用である。

AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、AQ27受容体の発現を促進し、AQ27受容体の機能を促進することができるので、例えば、AQ27受容体の機能不全に関連する疾患などの予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌促進剤などの医薬として有用である。

AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、AQ27受容体の発現を阻害し、AQ27受容体の機能を阻害することができるので、例えば、AQ27受容体の発現過多に関連する疾患などの予防・治療剤、副腎皮質ホルモン分泌阻害剤などの医薬として有用である。

AQ27受容体の機能不全に関連する疾患としては、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)などが含まれる。

AQ27受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、本発明のペプ 20 チドFの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆 /膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾 患などが挙げられる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

25 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、 前記したAQ27受容体またはその塩とリガンドとの結合性を変化させる化 合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒト または哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、 ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に糖尿病患者(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~20mg投与する。 非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常、糖尿病患者(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

10

15

20

25

このように、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、AQ27 受容体DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物また はその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、AQ27受容体DN A発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大き く貢献することができる。

また、AQ27受容体のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物(遺伝子移入動物)を作成すれば、特異的にそのAQ27受容体を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、AQ27受容体そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。ま

たアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA:デオキシリボ核酸

c D N A : 相補的デオキシリボ核酸

5 A : アデニン

T:チミン

G: グアニン

C:シトシン

I:イノシン

10 R: アデニン(A) またはグアニン(G)

Y: チミン(T) またはシトシン(C)

M:アデニン(A) またはシトシン(C)

K: グアニン(G) またはチミン(T)

S: グアニン(G) またはシトシン(C)

15 $W: \mathcal{P}^{\mathcal{F}} = \mathcal{V}(A)$ またはチミン(T)

B: グアニン(G)、グアニン(G) またはチミン(T)

D:アデニン(A)、グアニン(G) またはチミン(T)

V:アデニン(A)、グアニン(G) またはシトシン(C)

N:アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)もしくはチミン(T)

20 または不明もしくは他の塩基

RNA : リポ核酸

mRNA :メッセンジャーリボ核酸

dATP: デオキシアデノシン三リン酸

dTTP : デオキシチミジン三リン酸

25 d G T P : デオキシグアノシン三リン酸

dCTP : デオキシシチジン三リン酸

ATP : アデノシン三リン酸

EDTA:エチレンジアミン四酢酸

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

BHA:ベンズヒドリルアミン

pMBHA: pーメチルベンズヒドリルアミン

Tos: p-トルエンスルフォニル

Bz1 :ベンジル

5 Bom : ベンジルオキシメチル

Boc: tープチルオキシカルボニル

DCM : ジクロロメタン

HOBt : 1ーヒドロキシベンズトリアゾール

DCC: N, N'ージシクロヘキシルカルボジイミド

10 TFA : トリフルオロ酢酸

DIEA : ジイソプロピルエチルアミン

Gly又はG:グリシン

Ala又はA:アラニン

Val又はV :バリン

15 Leu又はL : ロイシン 🌣

Ile又はI:イソロイシン

Ser又はS :セリン

Thr又はT:スレオニン

Cys又はC:システイン

20 Met 又はM : メチオニン

Glu又はE:グルタミン酸

Asp又はD:アスパラギン酸

Lys又はK:リジン

Arg又はR:アルギニン

25 His又はH:ヒスチジン

Phe又はF:フェニルアラニン

Tyr又はY:チロシン

Trp又はW:トリプトファン

Pro又はP :プロリン

Asn又はN:アスパラギン

Gln又はQ:グルタミン

pGlu:ピログルタミン酸

5 DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

Fmoc: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

Trt: トリチル

Pbf : 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンプフラン-5-

スルホニル

10 Clt : 2-クロロトリチル

Bu^t : tープチル

Met(O):メチオニンスルフォキシド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号:1]

15 分泌ペプチドAのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号:2〕

前駆体蛋白質Aのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:3]

前駆体蛋白質Bのアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号: 4〕

前駆体蛋白質Cのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:5]

前駆体蛋白質Dのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:6]

25 前駆体蛋白質Eのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:7]

分泌ペプチドAをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:8]

前駆体蛋白質AをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号:9〕

前駆体蛋白質BをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:10]

前駆体蛋白質CをコードするDNAの塩基配列を示す。

5 [配列番号:11]

前駆体蛋白質DをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:12]

前駆体蛋白質EをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:13]

10 実施例1で前駆体蛋白質Aをコードする c DNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:14]

実施例1で前駆体蛋白質AをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

15 〔配列番号:15〕

実施例2で前駆体蛋白質BをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:16]

実施例 2 で前駆体蛋白質 B をコードする c DNA のスクリーニングに使用し 20 た合成 DNA を示す。

[配列番号:17]

実施例3で前駆体蛋白質CをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:18]

25 実施例3で前駆体蛋白質CをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:19]

実施例4で前駆体蛋白質DをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:20]

実施例4で前駆体蛋白質DをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:21]

5 実施例 5 で前駆体蛋白質 E をコードする c DNA のスクリーニングに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号:22]

実施例5で前駆体蛋白質EをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

10 〔配列番号:23〕

前駆体蛋白質Fのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:24]

前駆体蛋白質FをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:25]

15 実施例6で前駆体蛋白質FをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:26]

実施例 6 で前駆体蛋白質 F をコードする c DNAのスクリーニングに使用した合成 DNAを示す。

20 〔配列番号: 27〕

前駆体蛋白質Gのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:28]

前駆体蛋白質GをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:29]

25 実施例7で前駆体蛋白質GをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:30]

実施例7で前駆体蛋白質GをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:31]

ヒトAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号:32]

ヒトAQ27受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

5 〔配列番号:33〕

ラットOT7T022受容体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号:34]

ラットOT7T022受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:35]

10 ヒトOT7T022受容体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号:36]

ヒトOT7T022受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:37]

ヒトOT7T022受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

15 〔配列番号:38〕

前駆体蛋白質Hのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:39]

前駆体蛋白質HをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:40]

20 実施例10で前駆体蛋白質HをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

[配列番号:41]

実施例10で前駆体蛋白質HをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

25 〔配列番号:42〕

前駆体蛋白質Iのアミノ酸配列を示す。

[配列番号:43]

前駆体蛋白質IをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:44]

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 248

ラットAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号:45]

ラットAQ27受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:46]

5 マウスAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号:47]

マウスAQ27受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号:48]

実施例21で前駆体蛋白質 I をコードする c DNAのスクリーニングに使用 した合成DNAを示す。 10

[配列番号:49]

実施例21で前駆体蛋白質IをコードするcDNAのスクリーニングに使用 した合成DNAを示す。

[配列番号:50]

15 実施例22でラットAQ27をコードするcDNAのスクリーニングに使用 した合成DNAを示す。

[配列番号:51]

実施例22でラットAQ27をコードするcDNAのスクリーニングに使用 した合成DNAを示す。

20 [配列番号:52]

> 実施例22でマウスAQ27をコードするcDNAのスクリーニングに使用 した合成DNAを示す。

[配列番号:53]

実施例22でマウスAQ27をコードするcDNAのスクリーニングに使用 した合成DNAを示す。 25

[配列番号:54]

実施例24で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号:55]

実施例24で使用したプライマーの塩基配列を示す。

実施例24で使用したプローブの塩基配列を示す。

[配列番号:57]

[配列番号:56]

実施例25で使用したプライマーの塩基配列を示す。

5 〔配列番号:58〕

実施例25で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号:59]

実施例25で使用したプローブの塩基配列を示す。

[配列番号:60]

10 実施例26で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号:61]

実施例26で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号:62]

実施例26で使用したプローブの塩基配列を示す。

15 〔配列番号:63〕

25

実施例26で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号:64]

実施例26で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号:65]

20 実施例26で使用したプローブの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体Escherichia coli J M109/pTA-S65は、2001年9月19日から茨城県つくば市東1 丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7742として、2001年9月6日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IF O 16697として寄託されている。

後述の実施例2で得られた形質転換体Escherichia coli J M109/pTA-S66は、2001年9月19日から茨城県つくば市東1 丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術 総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7743とし て、2001年9月6日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵 便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IF O 16698として寄託されている。

5

10

15

20

25

後述の実施例3で得られた形質転換体Escherichia coli J M109/pTA-S67は、2001年9月19日から茨城県つくば市東1 丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7744として、2001年9月11日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IF O 16699として寄託されている。

後述の実施例4で得られた形質転換体Escherichia coli J M109/pTA-S68は、2001年9月19日から茨城県つくば市東1 丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7745として、2001年9月11日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IF O 16700として寄託されている。

後述の実施例5で得られた形質転換体Escherichia coli J M109/pTA-S69は、2001年9月19日から茨城県つくば市東1 丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7746として、2001年9月11日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IF O 16701として寄託されている。

後述の実施例6で得られた形質転換体Escherichia coli J M109/pTAhFRF-1は、2002年2月18日から茨城県つくば市 東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業 技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7903 として、2002年2月6日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号 IFO 16752として寄託されている。

後述の実施例7で得られた形質転換体Escherichia coli J M109/pTArFRF-1は、2002年2月18日から茨城県つくば市 東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)の独立行政法人産業 技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7905 として、2002年2月6日から大阪府太阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号 IFO 16754として寄託されている。

後述の実施例10で得られた形質転換体Escherichia coli JM109/pTAmFRF-1は、2002年2月18日から茨城県つくば 市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産 業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-790 4として、2002年2月6日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-8 5(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番 号IFO 16753として寄託されている。

15

25

後述の実施例21で得られた形質転換体Escherichia coli JM109/pTAbFRF-1は、2002年8月21日から茨城県つくば 市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産 業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-816 2として寄託されている。

後述の実施例22で得られた形質転換体Escherichia coli JM109/pCR2. 1-ratAQ27は、2002年8月21日から茨 城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)の独立 行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM B P-8163として寄託されている。

後述の実施例23で得られた形質転換体Escherichia coli

JM109/pCR2. 1-mouseAQ27は、2002年8月21日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8164として寄託されている。

5 実施例

10

15

20

25

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の 範囲を限定するものではない。

実施例1 ヒト全脳 cDNA からの PCR 法による新規分泌蛋白質の遺伝子の取得 クローンテック社より購入したヒト全脳 cDNA を鋳型として、以下の2種類の合成 DNA を用いて、PCR による増幅を行った。

C216F: 5'-GTCGACCATGGGGCCTGGACGATGCCTCCTGACG-3' (配列番号:13)

C216R: 5'-GCTAGCCTATCTTGCGGCCAGGTGTCGAGTAGT-3' (配列番号:14)

PCR の反応液は cDNA 溶液 1 microl、0.5 microl C216F (10 microM)、0.5 microl C216R (10 microM)、2.5 microl 添付の10x反応液、2.5 microl dNTP (10 mM)、 0.5 microl KlenTag (クローンテック) 、17.5 microl 大塚蒸留水を加えて合計 25 microl にした。反応液を、ThermalCycler9600 を用いて PCR 反応にかけた。 PCR の条件は95℃・2 分の変性の後、98℃・10 秒、63℃・20 秒、72℃・60 秒 のサイクルを 40 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 300 bp の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を Quiagen PCR purification Kit を用 いて精製し、直接配列決定を行ったところ図1で示す配列がえられた。図1の DNA 配列から予測されるアミノ酸配列は図2に示すものであった。また図2のア ミノ酸配列の1から17番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。さ らに生成するペプチドとして Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro Pro Pro Cys Pro Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His Leu Ala Ala Arg (配 列番号:1) が予想された。次に、ゲルから回収した PCR 産物を TA クローニン グキット (Invitrogen 社) を用いて大腸菌 JM109 にサプクローニングし、大腸

菌 JM109/pTA-S65 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTA-S65 をプラスミド抽出機(クラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図1と同じヒト型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。

PCT/JP02/08872

5 実施例2 ヒト胎盤 cDNA からの PCR 法による新規分泌蛋白質の遺伝子の取得 クローンテック社より購入したヒト胎盤 cDNA を鋳型として、以下の2種類の 合成 DNA を用いて、PCR による増幅を行った。

:C2008F 5'-GTCGACCATGTGGCCCCGAAAACTCGCCTGGATT-3' (配列番号:15)

: C2008R 5'-GCTAGCCTAGTATCCCCATCCTCTCCCTAATTC-3' (配列番号: 1 6)

PCR の反応液は cDNA 溶液 1 microl、0.5 microl C2008F(10 microM)、0.5 microl C2008R(10 microM)、2.5 microl 添付の 10 x 反応液、2.5 microl dNTP(10 mM)、0.5 microl KlenTaq(クローンテック)、17.5 microl 大塚蒸留水を加えて合計 25 microl にした。反応液を、ThermalCycler9600 を用いて PCR 反応にかけた。PCR の条件は 95℃・2 分の変性の後、98℃・10 秒、63℃・20 秒、

72 ℃・60 秒のサイクルを 40 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 600 bp の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を Quiagen PCR purification Kit を用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図 3 で示す配列がえられた。図 3 の DNA 配列から予測されるアミノ酸配列は図 4 に示すものであった。また図 4 のアミノ酸配列の第 1 番目から 2 1 番目のアミノ酸配列は

20 分泌シグナルと予想された。また生成するペプチドとして、図4のアミノ酸配列の第22番目から37番目のアミノ酸配列を有するペプチドのアミド、図4の第40番目から55番目のアミノ酸配列を有するペプチドのアミドなどが予想された。次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット

25 JM109/pTA-S66 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTA-S66 をプラスミド抽出機 (クラボウ社) を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図3と同じヒト型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。

(Invitrogen 社)を用いて大腸菌 JM109 にサプクローニングし、大腸菌

実施例3 ヒト全脳 cDNA からの PCR 法による新規分泌蛋白質の遺伝子の取得

10

15

20

. 25

クローンテック社より購入したヒト全脳 cDNA を鋳型として、以下の2種類の合成 DNA を用いて、PCR による増幅を行った。

C196F 5'-GTCGACCATGCGGGCGCCACTCTGCCTGCTCCTG-3' (配列番号: 1 7)
C196R 5'-GCTAGCTCAGGGCTGCAGGCCGGGCTGCGGGGG-3' (配列番号: 1 8)

PCR の反応液は cDNA 溶液 1 microl、0.5 microl C196F (10 microM)、0.5 microl C196R (10 microM)、2.5 microl 添付の 10 x 反応液、2.5 microl dNTP (10 mM)、 0.5 microl KlenTag (クローンテック) 、17.5 microl 大塚蒸留水を加えて合計 25 microl にした。反応液を、ThermalCycler9600 を用いて PCR 反応にかけた。 PCR の条件は 95℃・2 分の変性の後、98℃・10 秒、63℃・20 秒、72℃・60 秒 のサイクルを 40 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 700bp の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を Quiagen PCR purification Kit を用 いて精製し、直接配列決定を行ったところ図5で示す配列がえられた。図5の DNA 配列から予測されるアミノ酸配列は図6に示すものであった。また図6のア ミノ酸配列の1から14番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。さ らに生成するペプチドとして、図6のアミノ酸配列の第15番目~21番目の アミノ酸配列を有するペプチド、図6のアミノ酸配列の第26番目~58番目 のアミノ酸配列を有するペプチド、図6のアミノ酸配列の第60番目~88番 目のアミノ酸配列を有するペプチド、図6のアミノ酸配列の第90番目~10 7番目または図6のアミノ酸配列の第110番目~187番目のアミノ酸配列 のアミノ酸配列を有するペプチド等が予想された。次に、ゲルから回収した PCR 産物をTAクローニングキット (Invitrogen 社) を用いて大腸菌 JM109 にサブク ローニングし、大腸菌 JM109/pTA-S67 を取得した。サブクローニングで得られ た大腸菌からプラスミドpTA-S67をプラスミド抽出機(クラボウ社)を用いて 抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図5と同じヒト型分泌蛋白 質遺伝子 cDNA であることを確認した。

実施例4 ヒト全脳 cDNA からの PCR 法による新規分泌蛋白質の遺伝子の取得 クローンテック社より購入したヒト全脳 cDNA を鋳型として、以下の2種類の合成 DNA を用いて、PCR による増幅を行った。

: C296F 5'-GTCGACCATGGGGGCCCCGCTCGCCGTAGCGCTG-3' (配列番号:19)

10

15

20

25

: C296R 5'-GCTAGCTCACTGTCCACACCCCCAGGTCCAAGT-3' (配列番号:20) PCR の反応液は cDNA 溶液 1 microl、0.5 microl C296F (10 microM)、0.5 microl C296R (10 microM)、2.5 microl 添付の 10 x 反応液、2.5 microl dNTP (10 mM)、 0.5 microl KlenTag (クローンテック)、17.5 microl 大塚蒸留水を加えて合計 25 microl にした。反応液を、ThermalCycler9600 を用いて PCR 反応にかけた。 PCR の条件は 95℃・2 分の変性の後、98℃・10 秒、63℃・20 秒、72℃・60 秒 のサイクルを 40 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 500 bp の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を Quiagen PCR purification Kit を 用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図7で示す配列がえられた。図7 のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図8に示すものであった。また図8 のアミノ酸配列の1から24番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。 さら生成するペプチドとして、図8のアミノ酸配列の第25番目~85番目の アミノ酸配列を有するペプチド、図8のアミノ酸配列の第86番目~114番 目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは図8のアミノ酸配列の第115番目 ~166番目のアミノ酸配列を有するペプチドが予想された。次に、ゲルから 回収した PCR 産物を TA クローニングキット (Invitrogen 社) を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pTA-S68 を取得した。サブクローニ ングで得られた大腸菌からプラスミド pTA-S68 をプラスミド抽出機 (クラボウ 社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図7と同じヒ

PCT/JP02/08872

実施例5 ヒト全脳 cDNA からの PCR 法による新規分泌蛋白質の遺伝子の取得 クローンテック社より購入したヒト全脳 cDNA を鋳型として、以下の2種類の合成 DNA を用いて、PCR による増幅を行った。

ト型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。

C118Batg: 5'- GTCGACCATGGCCCCAGCCTTCCTGCTGCTGCTG -3' (配列番号:21) C118Bstop: 5'- GCTAGCCTAGTACCGGCCGCCAGTGTGCTGGAA -3' (配列番号:22) PCR の反応液は cDNA 溶液 1 microl、0.5 microl C216F (10 microM)、0.5 microl C216R (10 microM)、2.5 microl 添付の 10 x 反応液、2.5 microl dNTP (10 mM)、0.5 microl KlenTaq (クローンテック)、17.5 microl 大塚蒸留水を加えて合計 25 microl にした。反応液を、ThermalCycler9600を用いて PCR 反応にかけた。

PCR の条件は95℃・2 分の変性の後、98℃・10 秒、63℃・20 秒、72℃・60 秒 のサイクルを 40 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 300 bp の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を Quiagen PCR purification Kit を用 いて精製し、直接配列決定を行ったところ図9で示す配列がえられた。図9の DNA 配列から予測されるアミノ酸配列は図10に示すものであった。また図10 のアミノ酸配列の1から18番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。 さらに生成するペプチドとして、図10のアミノ酸配列の第19番目~58番 目のアミノ酸配列を有するペプチド、図10のアミノ酸配列の第63番目~2 02番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは図10のアミノ酸配列の第2 05番目~241番目のアミノ酸配列を有するペプチドが予想された。次に、 10 ゲルから回収した PCR 産物を TA クローニングキット (Invitrogen 社) を用いて 大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pTA-S69 を取得した。サブ クローニングで得られた大腸菌からプラスミドpTA-S69 をプラスミド抽出機(ク ラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図9と 同じヒト型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。 15

実施例 6 ヒト cDNA からの PCR 法による新規分泌蛋白質遺伝子の取得 クローンテック社より購入した Human Universal cDNA を鋳型として、以下 の 2種類の合成 DNA を用いて、PCR による増幅を行った。

(配列番号:25)

RFR1 5'-CAAATCCTTCCAAGGCGTCCTGGCCCT-3' (配列番号: 2 6)

RFF2 5'-ATGGTAAGGCCTTACCCCCTGATCTAC-3'

20

25

PCR の反応液は cDNA 溶液 1 microl、0.5 microl RFF2 (10 microM)、0.5 microl RFR1 (10 microM)、2.5 microl 添付の 10 x 反応液、2.5 microl dNTP (10 mM)、0.25 microl ExTaq (タカラ)、17.75 microl 大塚蒸留水を加えて合計 25 microl にした。反応液を、ThermalCycler9600を用いて PCR 反応にかけた。PCR の条件は95℃・2 分の変性の後、98℃・10 秒、60℃・20 秒、72℃・30 秒のサイクルを40 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 400 bp の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を Quiagen PCR purification Kit を用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図 1 1 で示す配列がえられた。図 1 1 の DNA 配列から予測されるアミノ酸配列は図 1 2 に示すものであった。また、図 1 2 のア

25

- ミノ酸配列の1から18番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。 さらに、生成するペプチドとして、
- (1) C末端がアミド化された、図12(配列番号:23)に示されたアミノ酸配列の第26番目~第88番目のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- (2) C末端がアミド化された、図12(配列番号:23)に示されたアミノ酸配列の第80番目~第88番目のアミノ酸配列を含有するペプチド、
 - (3) C末端がアミド化された、図12(配列番号:23)に示されたアミノ酸配列の第91番目~第133番目のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- (4) C末端がアミド化された、図12(配列番号:23)に示されたアミノ10 酸配列の第127番目~第133番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが考えられる。

次に、ゲルから回収した PCR 産物を TA クローニングキット(Invitrogen 社)を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pTAhFRF-1 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTAhFRF-1 をプラスミド抽出機(クラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図11と同じヒト型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。実施例7 ラットゲノム DNA からの PCR 法によるリガンド候補遺伝子の取得クローンテック社より購入した Rat Genomic DNA を鋳型として、以下の2種類の合成 DNA を用いて、PCR による増幅を行った。

20 F1 5'-CCTCCTCTCTCCTCTCTCTCAG-3' (配列番号: 29)
R1 5'-ACGGGGCAGAGTCCACGCAGGCCCTCA-3' (配列番号: 30)

PCR の反応液は DNA 溶液 1 microl、0.5 microl F1 (10 microM)、0.5 microl R1 (10 microM)、2.5 microl 添付の 10 x 反応液、2.5 microl dNTP (10 mM)、0.25 microl ExTaq (タカラ)、17.75 microl 大塚蒸留水を加えて合計 25 microl にした。反応液を、Thermal Cycler9600を用いて PCR 反応にかけた。PCR の条件は95℃・2 分の変性の後、98℃・10 秒、60℃・20 秒、72℃・30 秒のサイクルを 30 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 400 bp の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を Quiagen PCR purification Kit を用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図 1 3 で示す配列がえられた。図 1 3 の DNA

配列から予測されるアミノ酸配列は図14に示すものであった。また図14の アミノ酸配列の1から17番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。

またヒト型とラット型のアミノ酸配列を比較したところ図15のようになり、特に C 末端の RF アミドモチーフの配列 (Arg Phe Gly Arg) が保存されていた。さらに、生成するペプチドとして C 末端がアミド化された Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH₂ (配列番号:27の第116番目~第122番目)、Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH₂ (配列番号:27の第115番目~第122番目)等が予想された。

5

10

20

次に、ゲルから回収した PCR 産物を TA クローニングキット (Invitrogen 社)を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pTArFRF-1 を取得した。サプクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTArFRF-1 をプラスミド抽出機 (クラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図13と同じラット型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。実施例8

15 (1) Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第127番目~ 第133番目) および Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第80番目~第88番目)の合成

Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第127番目〜第133番目)および Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第80番目〜第88番目)を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

(2) Arg-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第 124番目~第133番目)の合成

Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第124番目〜第133番目)を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

25実施例9新規ポリペプチドF: Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH2 (配列番号: 23の第127番目~第133番目) および

Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第80番目〜第88番目)のAQ27受容体およびOT7T022受容体を一過性に発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性

実施例 8 で合成した新規ポリペプチドFによるAQ27受容体(配列番号: 31) およびヒトOT7T022受容体(配列番号: 35) に特異的な刺激活性の検出は、cAMPレスポンスエレメント(CRE)プロモーターの発現誘導によって産生されるレポーター遺伝子産物(ルシフェラーゼ)の発現量を指標に行った。

5

10

15

20

25

HEK293細胞を増殖培地 (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GibcoBRL) に10%ウシ胎児血清 (GibcoBRL) を添加したもの) に懸濁し、1×105cells/wellon濃度にてコラーゲンでコートされたBlackwell 96ウェルプレート (ベクトンディッキンソン社) にまいた。37℃、5%CO2条件下で一晩培養した後、レポーター遺伝子を含むプラスミドであるpCREーLuc (Clontech) と同時に、公知の方法により動物細胞での発現用ベクターpAKKO-111H (Biochem. Biophys. Acta, Hinuma, S. et al., 1219, 251-259, 1994 記載のpAKKO-1. 11Hと同一のプラスミドベクター) にAQ27遺伝子 (配列番号:32) およびヒトOT7T022遺伝子 (配列番号:36) を挿入して作製した発現ベクタープラスミド、または、AQ27遺伝子を含まないもとのpAKKO-111Hを用いて細胞のトランスフェクションを以下のとおりに行った。

OPTI-MEM-I (GibcoBRL) とLipofectamine TM 200 0 Reagent (GibcoBRL) を24:1にて混合することにより、リポフェクトアミン希釈液を調製した。また、OPTI-MEM-I、AQ27発現ベクタープラスミドまたはもとのベクタープラスミド (240 ng/ μ 1) およびpCRE-Luc (240 ng/ μ 1) を24:0.9:0.1にて混合することによりDNA希釈液を調製した。リポフェクトアミン希釈液とDNA希釈液を等量混合し、20分間室温で静置することによりDNAとリポフェクトアミンの複合体を形成させた後、上記のHEK293細胞を培養したプレートに25 μ 1添加し、さらに37 $^{\circ}$ C、5%CO2条件下で一晩培養した。

トランスフェクトしたHEK293細胞をアッセイ用培地(DMEMに0. 1%ウシ血清アルブミンを添加したもの)にて洗浄した後、アッセイ用培地に て希釈した実勢例8で合成した新規ポリペプチドFを10、1、0.1μMと

10

25

なるよう添加し、37℃、5%CO。条件下で4時間培養した。培養上清を捨て て、ルシフェラーゼ活性測定用の基質であるピッカジーンLT2. O (東洋イ ンキ製造株式会社)を50μ1添加し、プレートリーダー(ARVO sxマル チラベルカウンター、Wallac 社)を用いてルシフェラーゼの発光量を測定した。

その結果、2種類の新規ポリペプチドFはいずれもAQ27受容体に対しフ オルスコリン (FSK) 添加で刺激したルシフェラーゼ活性を濃度依存的に増 強する反応として検出された。一方、ヒトOT7T022受容体に対してはF SK添加で刺激したルシフェラーゼ活性を抑制する反応として検出された。こ れらの反応は受容体を導入していない空のベクターpAKKO-111 Hを発現さ せた細胞では検出されなかった。したがって、2種類の新規ポリペプチドFは AQ27受容体特異的にルシフェラーゼ活性の増強を、またヒトOT7T02 2受容体特異的にルシフェラーゼ活性の抑制を引き起こしたことが確認された (図16、図17、図18)。

実施例10 マウスゲノムDNAからのPCR法によるリガンド候補遺伝子の 15 取得

クローンテック社より購入したMouse Genomic DNAを鋳型 として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCR による増幅を行った。 F2 5'-ATGAGGGGCTTCCGGCCTTTGCTTTCC-3'(配列番号:40)

R2 5'-TCACCGTCCAAAGCGGAAGCTGAAGCC-3'(配列番号: 4 1)

PCRの反応液はDNA溶液1 microl、0.5 microl F 20 2 (10 microM), 0.5 microl R2 (10 micro M)、2.5 microl添付の10 x 反応液、2.5 microl dNTP (10 mM)、0.25 microl ExTaq (タカラ)、 17.75 microl大塚蒸留水を加えて合計25 microlにした。 反応液を、Thermal Cycler9600を用いてPCR反応にかけ た。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20 秒、72℃・30秒のサイクルを30回繰り返した。PCR産物の一部を用い て電気泳動で約400 bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物を Quiagen PCR purification Kitを用いて精製し、 直接配列決定を行ったところ図19で示す配列がえられた。図19の DNA 配列から予測されるアミノ酸配列は図20に示すものであった。また、図20のアミノ酸配列の1から17番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。さらに生成するペプチドとしてC末端がアミド化された Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH $_2$ (配列番号: 40の第116番目~第122番目)、Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH $_2$ (配列番号: 40の第115番目~第122番目)等が予想された。

次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット(Invitrogen 社)を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pTAmFRF-1 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTAmFRF-1 をプラスミド抽出機(クラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図19と同じマウス型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。実施例11 新規ポリペプチドF:

Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH 2 (配列番号: 23の第124番目~第133番目)のAQ27受容体およびOT7T022受容体を一過性に発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性

実施例9と同様の方法で新規ポリペプチドF:

10

15

20

25

Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第124番目~第133番目)の(1)AQ27受容体およびOT7T022受容体を一過性に発現させていないHEK293細胞(図21)、(2)AQ27受容体を一過性に発現させたHEK293細胞(図22)および(3)OT7T022受容体を一過性に発現させたHEK293細胞(図23)に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性を測定した。その結果、新規ポリペプチドはAQ27に対してはルシフェラーゼ活性の上昇作用を(図22)、またhOT7T022に対してはルシフェラーゼ活性の上昇作用を(図22)、またhOT7T022に対してはルシフェラーゼ活性の抑制作用を引き起こした(図23)。実施例12 ヒトAQ27発現CHO細胞におけるcAMP産生抑制活性の検出

自体公知の方法で樹立したAQ27発現CHO細胞(図24)およびコントロールとなるmock CHO細胞(図25)を、4x104/wellの濃度

にて96ウェルプレート(ベクトンデッキンソン)に撒いて、一晩培養した。アッセイ用バッファーにはHanks' Balanced Salt Solu tionに0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.2 mM 3-Isobut yl-1-methylxanthineを添加したものを用いた。アッセイ 用バッファーで細胞を2回洗浄し、37℃で30分間プレインキュベーション した。再度細胞を2回洗浄したのちにアッセイ用バッファーで調製したサンプルを添加し、37℃で30分間インキュベーションした。cAMP産生抑制活性を評価するため、cAMP産生上昇を促進するホルスコリン(FSK、和光純薬)2μMのみのサンプルと同濃度のFSKと10⁻⁷~10⁻⁵Mの新規ポリペプチドF:Arg-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH2(配列番号:23の第124番目~第133番目)を含むサンプルで比較した。細胞の上清を捨てて、cAMP Screen System(アプライドバイオシステムズ)によって細胞内のcAMP産生量を測定した。その結果、図24に示す通り、AQ27発現CHOにおいてのみ、FSKで誘導されたcAMP産生がペプチドの添加によって抑制された。

5

10

15

20

25

実施例13 AQ27発現CHO細胞における細胞内カルシウムイオン遊離促進活性の検出

自体公知の方法で樹立したAQ27発現CHO細胞を96-wellの黒色培養プレート(Costar社)に4×10 cells/wellの細胞数で播種し、一晩培養した。Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) に20mMのHEPES (pH7.4, 同仁化学研究所)、2.5mM probenecid (Sigma社)を添加したものをアッセイバッファーとして用意した。細胞の培地を除去し、アッセイバッファーとして用意した。細胞の培地を除去し、アッセイバッファーに4μMのFluo 3-AM(Dojindo社)および0.04% Pluronic acid (Morecular Probes社)を添加したものを加え、37℃で1時間インキュベーションした。細胞をアッセイバッファーで洗浄して過剰なFluo 3を除去し、FLIPR(モレキュラーデバイス社)にセットした。アッセイバッファーに溶解した検体も同じくFLIPRにセットした後、内蔵のマニュピレーターによってサンプルを細胞に添加

し、励起光の照射によって発生する細胞内カルシウムイオン濃度に依存した蛍光量の変化を測定した。その結果、サンプル無添加(〇)に対し、新規ポリペプチドF:Arg-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH $_2$ (配列番号:23の第124番目~第133番目;RKKGGFSFRF-NH $_2$)および新規ポリペプチドF:Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH $_2$ (配列番号:23の第127番目~第133番目;GGFSFRF-NH $_2$)について、10 μ M(\spadesuit)、1 μ M(\Box)ではそれぞれ図26および図27に示すような反応が検出され、それぞれのペプチドによってAQ27発現CHO細胞の細胞内カルシウムイオン遊離促進活性が検出された。

10 実施例14

20

(1)

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg
-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第108番目~ 第133番目;T1-F26-NH₂)の合成

T1-F26-NH₂を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。 (2)

Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH₂(配列番号:23の第91番目~第133番目;Pyr1-F43-NH₂)の合成Pyr1-F43-NH₂を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

- (3) Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly
 -Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH2(配列番号: 23の第61番目~第86番目;A1-F28-NH2)の合成
- 25 $A1-F28-NH_2$ を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。 実施例15

新規ポリペプチドF:

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg -Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH2(配列番号:23の第108番目~ 第133番目; T1-F26-NH。) および

Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH2(配列番号:23の第91番目~第133番目;Pyr1-F43-NH2)のヒトAQ27受容体を一過性に発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性

実施例9と同様の方法を用いて、実施例14で合成した新規ポリペプチドT $1-F26-NH_2$ および $Pyr1-F43-NH_2$ の(1)AQ27受容体を一過性に発現させていないHEK293細胞(図28)、(2)AQ27受容体を一過性に発現させたHEK293細胞(図29)に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性を測定した。その結果、それぞれのポリペプチドによってAQ27受容体を発現させたHEK293細胞においてルシフェラーゼ活性の上昇が検出された。

実施例16

5

10

15 新規ポリペプチドPyr 1-F43-NH₂によるAQ27発現CHO細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検出

実施例13と同様の方法により、新規ポリペプチドPyr1-F43-NH2によるAQ27発現CHO細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検討を行った。その結果、図30に示す通り10-8M以上の新規ポリペプチドPyr201-F43-NH2の添加によって、CHO-AQ27特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性が認められた。一方、図31に示す通り、コントロールとなるmock CHO細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ27のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。実施例17

25 新規ポリペプチドPyr 1-F43-NH₂によるAQ27発現CHO細胞特異的なcAMP産生抑制活性

実施例12の方法と同様の方法により、新規ポリペプチドPyr 1-F $43-NH_2$ によるAQ 2 7発現CHO細胞特異的なc AMP産生抑制活性を検出した。その結果、図3 2に示す通り、AQ 2 7発現CHO特異的に、F S K で誘

導された c AMP 産生が新規ポリペプチド Pyr 1-F43-NH₂の添加によって抑制された。一方、図33に示す通り、コントロールとなるmock CH O細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ27のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。

5 実施例18

新規ポリペプチドF: Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH2(配列番号:23の第61番目〜第86番目;A1-F28-NH2)のヒトAQ27受容体を一過性に発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活

10 性

15

実施例9と同様の方法を用いて、実施例14で合成した新規ポリペプチド $F:A1-F28-NH_2$ の(1)AQ27受容体を一過性に発現させていない HEK293細胞(図34)、(2)AQ27受容体を一過性に発現させたHEK293細胞(図35)に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性を測定した。その結果、 $A1-F28-NH_2$ によってAQ27受容体を発現させたHEK293細胞においてルシフェラーゼ活性の上昇が検出された。

実施例19

新規ポリペプチドA $1-F28-NH_2$ によるAQ27発現CHO細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検出

20 実施例13と同様の方法により、新規ポリペプチドA1ーF28ーNH2によるAQ27発現CHO細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検討を行った。その結果、図36に示す通り 10^{-6} M以上の新規ポリペプチドA1ーF28ーNH2の添加によって、CHOーAQ27特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性が認められた。一方、図37に示す通り、コントロールとなるmock CHO細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ27のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。

実施例20

新規ポリペプチドA1-F28-NH₂によるAQ27発現CHO細胞特異的なcAMP産生抑制活性

実施例120方法と同様の方法により、新規ポリペプチドA1-F28-N H_2 によるAQ27発現CHO細胞特異的なcAMP産生抑制活性を検出した。その結果、図38に示す通り、AQ27発現CHO特異的に、FSKで誘導されたcAMP産生が 10^{-6} M以上の新規ポリペプチドA1-F28-N H_2 の 添加によって抑制された。一方、図39に示す通り、コントロールとなるm o ck CHO細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ27のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。

実施例21 ウシゲノムDNAからのPCR法による新規分泌蛋白質 I 遺伝子の取得

10 クローンテック社より購入したBovine Genomic DNAを 鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行っ た。

b F 5'- ATGCGGAGCCCTTACTCCCTGCCCTAC -3' (配列番号: 48) b R 5'- TCACCGCCGACCGAAGCGGAAGCTGAA -3' (配列番号: 49)

5

PCRの反応液はDNA溶液1 microl、0.5 microl b 15 F (10microM), 0.5microl bR (10microM), 2. 5microl添付の10x反応液、2. 5microl dNTP (1 0 mM) 、0. 25 microl ExTaq (タカラ) 、17. 75 mic rol大塚蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液を、Ther mal Cycler9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は 20 95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・30秒 のサイクルを30回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約40 ObpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuiagen PC R purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を行っ たところ図40で示す配列がえられた。図40のDNA配列から予測されるア 25 ミノ酸配列は図41に示すものであった。また図41のアミノ酸配列の1から 17番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。さらに生成するペプチ ドとして、C末端がアミド化された図41のアミノ酸配列の第124番目~1 31番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたはC末端がアミド化された図4

1のアミノ酸配列の第125番目 \sim 131番目のアミノ酸配列を有するペプチド等が予想される。

次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット(Invit rogen社)を用いて大腸菌JM109にサプクローニングし、大腸菌JM109/pTAbFRF-1。サプクローニングで得られた大腸菌からプラスミドpTAbFRF-1をプラスミド抽出機(クラボウ社)を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図40と同じヒト型分泌蛋白質遺伝子cDNAであることを確認した。

実施例22 ラット副腎cDNAからのPCR法によるAQ27受容体遺伝子の取得

ラット副腎のpolyA+RNA1μgからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScriptII逆転写酵素(GIBCO BRL社)を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、cDNAを得た。以下の2種類の合成DNAを用いて、PCR による増幅を行った。

15 F1 5'-CGTCGACGCATGCAGGCGCTCAACATCACCGCG -3' (配列番号: 5 0)
R2 5'-CACTAGTTTACAGTTCATGGCCACTACCAAAAGTA -3'' (配列番号: 5 1)

10

20

25

PCRの反応液はcDNA溶液1microl、0.5microl F1 (10microM)、0.5microl R1 (10microM)、5 microl添付の5x反応液、2.5microl Gcmelt、2.5 microl dNTP (10mM)、0.5microl Advantage Gcmelt polymerase Mix (クローンテック)、12.5microl大塚蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液を、ThermalCycler9600を用いてPCR反応にかけた。PC Rの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、61℃・20秒、72℃・120秒のサイクルを35回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約1300bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuiagen PCR purification Kitを用いて精製し、TAクローニングキット(Invitrogen社)を用いて大腸菌JM109にサブクローニングし、大腸菌JM109/pCR2.1-ratAQ27を取得し

た。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミドpCR2.1-rat AQ27&Quiagen QIAwell 8 Ultra Plasmi d Kitを用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、図42で示す配列 がえられた。図42のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図43に示す ものであった。また、ヒト型およびマウス型AQ27との相同性は図46に示 すとおりであり、ラット型AQ27受容体であることが確認された。 実施例23 マウス脳cDNAからのPCR法によるAQ27受容体遺伝子

5

25

の取得

クローンテック マウスMTC Panelの脳cDNAを鋳型として、 10 以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。 F1 5'-CGTCGACGCATGCAGGCGCTCAACATCACCGCG -3' (配列番号: 5 2) R2 5'-CATCGATATTACAGTTCATGTCCACTGCCGAAAGTA -3' (配列番号:53) PCRの反応液はcDNA溶液1microl、0.5microl F1 (10microM), O. 5microl R1 (10microM), 5 microl添付の5x反応液、2.5microl Gcmelt、2.5 15 microl dNTP (10mM), 0.5microl Advanta ge Gcmelt polymerase Mix (クローンテック)、1 2. 5microl大塚蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液 を、ThermalCycler9600を用いてPCR反応にかけた。PC Rの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、59℃・20秒、72℃・ 20 120秒のサイクルを35回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動 で約1300bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuiag

en PCR purification Kitを用いて精製し、TAクロ ーニングキット(Invitrogen社)を用いて大腸菌 JM109にサブ クローニングし、大腸菌 JM109/pCR2. 1-mouseAQ27を取 得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド p C R 2. 1-m ouseAQ27&Quiagen QIAwell 8 Ultra Pl asmid Kitを用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、図44で 示す配列がえられた。図44のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図4

5に示すものであった。またヒト型およびラット型AQ27との相同性は図46のようであり、マウス型AQ27受容体であることが確認された。

実施例24 RT-PCRによるAQ27受容体mRNAのヒトにおける組織 分布の検討

- 鋳型となるcDNAには、ヒト各種組織由来のpolyA+RNA(クロン 5 テック社) から以下の方法で合成したものを使用した。 R N A 1 μ g からラン ダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScriptII逆転写酵素(G IBCO BRL社)を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、 反応終了後にエタノール沈殿して100 μ 1に溶解した。RT-PCRはSe quence Detection System Prism 7700 10 (PE Biosystems社)を用い、増幅と検出のためのプライマーと して5'-CCAGAACATTTCCGACAACTG-3'(配列番号: 54). 5'-ACAGCGGTAGACTGGACAAA-3'(配列番 号:55) およびTaqMan probeとして5'-(Fam)-TG CTTTCATTTGCAAGATGGTGCC-(Tamra)-3'(配 15 列番号:56)を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Unive rsal PCR Master Mix (PE Biosystems社) 12. 5μ 1に、それぞれ100 μ Mのプライマー溶液を0. 05μ 1、 5μ MのTaqMan probeを0.5 μl、および上記で調製したcDNA 溶液を 0. 5 μ 1 加え、蒸留水で総反応液量を 2 5 μ 1 とした。 P C R 反応は 20
- 25実施例25RT-PCRによるAQ27受容体mRNAのラットにおける組織分布の検討

鋳型となるcDNAには、ラット各種組織由来のpolyA+RNAから以下の方法で合成したものを使用した。RNA1μgからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScriptII逆転写酵素(GIBCO BRL

社)を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、反応終了後にエ タノール沈殿して100 μ lに溶解した。RTーPCRはSequence Detection System Prism 7700 (PE Bios ystems社)を用い、増幅と検出のためのプライマーとして5'-CGG AAGCCTGGGAATTCTG-3'(配列番号:57),5'-ATG TGTCTCCTTTGGTTTCTTCCA-3'(配列番号:58) よ びTagMan probeとして5' - (Fam) -AGCAAAGTTA TCTCGACCACAGCGTCCA-(Tamra)-3'(配列番号: 59) を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems社) 12.5μ 1に、それぞれ 100μ Mのプライマー溶液を 0.05μ 1、 5μ MのTaqMan probeを 0.5μ 1、および上記で調製したcDNA溶液を0.5 μ 1 加え、蒸留水で総反応液量を 2 5 μ 1 とした。 P C R 反応は 5 0 ℃・ 2 分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回 繰り返した。得られたラット各種組織におけるAQ27受容体のmRNA発現 量はtotal RNA 25ngあたりのコピー数として算出した(図48)。 実施例26 RT-PCRによる新規分泌蛋白質GのmRNAのラットにお ける組織分布の検討

10

15

25

Wistarラットより各種臓器を摘出し、total RNAをIso gen (ニッポンジーン社)、poly (A) †RNAをmRNA puri 20 fication kit (Pharmacia社)により、それぞれのマ ニュアルにしたがって調製した。得られた $poly(A)^+RNA 1 \mu g を$ DnaseI (Amplification Grade, GIBCO B RL社) 処理後、160ng分をRNA PCR Kit (Takara社) を用いて、マニュアルに従い42℃でcDNAを合成した。合成されたcD NAはpoly (A) [†]RNA換算で4ng/μlの溶液とし、以後のRTー PCRの鋳型として用いた。RT-PCRはSequence Detec tion System Prism 7700 (PE Biosyste ms社)を用い、増幅と検出のためのプライマーとして5'-AGCACA

CTGGCTTCCGTCTAG-3'(配列番号:60),5'-CGCTGGCCTTCTCTGAGTCA-3'(配列番号:61)およびTaqMan probeとして5'-(Fam)AGGCAGGACAGTGGCAGTGAAGCC-(Tamra)-3'(配列番号:62)を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Universal PCRMaster Mix(PE Biosystems社)12.5 μ 1に、それぞれ100 μ Mのプライマー溶液を0.225 μ 1、5 μ MのTaqMan probeを1.25 μ 1、および上記で調製したcDNA溶液を0.5 μ 1加え、蒸留水で総反応液量を25 μ 1とした。PCR反応は50℃・2分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返した。得られたラット各種組織における新規分泌蛋白質GのmRNA発現量はpoly(A)+RNA 1ngあたりのコピー数として算出した(図49)。

5

10

15

20

25

実施例27 RT-PCRによる新規分泌蛋白質FのmRNAのヒトにおける 組織分布の検討

mRNAの発現量検出のためのRT-PCRの鋳型となるcDNAには、ヒト各種組織由来のpolyA+RNA (クロンテック社) から以下の方法で合成したものを使用した。RNA1μgからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScriptII逆転写酵素 (GIBCO BRL社) を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、反応終了後にエタノール沈殿して100μlに溶解した。発現量の定量はSequence Detection System Prism 7700を用いて行った。増幅と検出のためのプライマーとして5'-TGAGAGCTTCACAGCCACA-3'(配列番号:63),5'-AGCTGAAGCCGCCTTTCTT-3'(配列番号:64) およびTaqMan probeとして5'-(Fam)AACCTGGCTGAGGAGCTCAATGGCTA-(Tamra)-3'(配列番号:65)を使用した。RT-PCR反応は実施例24と同様の方法で行った。得られたヒト各種組織における新規分必蛋白質FのmRNA発現量はpoly(A) +RNA 1ngあたりのコピー数として算出した(図50)。

実施例28 in situハイブリダイゼーション法による新規分泌蛋白質 mRNAのラット脳における発現分布の検討

Wistarラットをネンブタール麻酔下で開腹し、左心室から0.9%食塩水を5分間潅流し、続いて4%パラホルムアルデヒド溶液を5分間潅流した。取り出した脳を同溶液中に24時間4℃で浸漬したのち、30%スクロース溶液に置換し、4℃で3日間浸漬し、解析に供する脳のサンプルを得た。

5

新規分泌蛋白質アンチセンス、センスプローブは以下の方法で調製した。

まず、プラスミドベクターpCRII TOPO(インビトロジェン社)に 自体公知の方法でラット型AQ27リガンドcDNAを挿入した。このcDN 10 Aを、M13プライマー(インビトロジェン社)・Advantage GC 2ポリメラーゼ(クロンテック社)を用いたPCRにて増幅・直鎖化し、エタ ノール沈殿法により精製した。このcDNAから、DIG RNA Labe lling KIT (SP6/T7) (ロッシュ社)にてSP6もしくはT 7によるin vitro transcriptionを行い(40μlス ケール)、生成されたDIGラベルリボプローブをエタノール沈殿により精製 した。精製したプローブは大塚精製水100μlに溶解した。cDNAの挿入 方向から、SP6により生成されたDIGラベルリボプローブがアンチセンス プローブ、T7により生成されたDIGラベルリボプローブがセンスプローブ であった。

In situハイブリダイゼーションにはフリーフローティング法を使用した。まずクライオスタットCM3050(ライカ社)を用いて40μmの厚さの前頭断凍結切片を作製した。つぎに切片をPBSで洗浄した後、1μg/ml Proteinase Kを含む10mM TrisーHCl / 1mM EDTA (pH8.0)処理(37℃・15分)にてプロテアーゼ処理を行った。さらに、0.25%無水酢酸を含む0.1Mトリエタノールアミン (pH8.0)による処理(室温・10分)にてアセチル化を行った後、hybridization buffer (50%ホルムアミド,10mM TrisーHCl pH7.5,1×Denhardt's solution, 200μg/ml tRNA,10%デキストラン硫酸,600mM

10

15

20

25

NaCl, 0. 25% SDS, 1mM EDTA) による処理 (60℃・2 0分)にてpre-hybridization反応を行った。Hybrid ization反応には、hybridization bufferでアン チセンスプローブもしくはセンスプローブを1000倍に希釈し、85℃で3 分変性した後、切片に加え60℃で12時間以上反応させた。引き続き、非特 異的にhybridizationしたプローブを洗浄するため以下の操作を 行った。1) 2×SSC (SSC; 1×SSC=150mM NaCl, 15 mMクエン酸ナトリウム, pH7. 0) / 50%ホルムアミド処理(60℃・ 15分·2回)、2) TNE (0.5M NaCl, 10mM Tris-H Cl(pH7.6), 1mM EDTA)処理(37℃·10分)、3)20 mg/ml RNase A in TNE処理 (37℃・30分)、4) T NE処理(37℃・10分)、5)2×SSC処理(60℃・15分・2回)、 6) 0. 5×SSC処理 (60℃・15分・2回)。以上の操作を行った後、D IGラベルプローブを検出するための免疫組織化学を行った。まず、DIGー 1 (100mM Tris-HCl pH7. 5, 150mM NaCl, 0. 1% Tween20) で洗浄した後、1.5% Blocking rea (ロッシュ社) を含むDIG-1による処理 (37℃・1時間) に gent て非特異反応のブロッキングを行い、anti-DIG fab-fragm ent antibody conjugated with alkali ne phosphatase (ロッシュ社)を含むDIG-1(1:100 0)を室温で1時間反応させた。DIG-1で十分洗浄した後、DIG-3(100mM Tris-HCl pH9. 5, 100mM NaCl, 50m M MgCl₂) でリンスし、0.18mg/ml 5-bromo-4-ch loro-3-indolyl-phosphate (BCIP)を含むジ メチルホルムアミド、および0.34mg/ml 4-nitroblue t etrazolium (NBT)を含む70%ジメチルホルムアミドを、D IG-3 1mlにつきそれぞれ3.5mlおよび4.5ml加えた溶液によ って、室温にて発色反応を行った。適時に発色をPBS洗浄により止めた後、 切片をスライドガラスに載せ、90%グリセロールを含むPBSで封入し、光

学顕微鏡で観察した。

10

20

25

アンチセンスプローブにて特異的に発色していたのは、視床下部のretrochiasmatic areaを中心に、arcuate nucleusの吻側、特に背側部・外側部にかけてであった。これらの領域においてセンスプローブによる発色は検出されなかった。

上記部位では、cocaineー and amphetamineーre gulated transcript (CART)、POMCが発現し(ともに摂食抑制)、またレプチン受容体が高濃度に存在することが知られている。このことから、AQ27リガンドは摂食を制御すると考えられる。arcuate nucleusはGHRHの存在する部位で、正中隆起外層に投射する神経があることが知られている。このことから、新規分泌蛋白質は神経内分泌に関与すると考えられる。さらに、実施例29に記すAQ27mRNAの分布と併せ考えると、新規分泌蛋白質が睡眠・覚醒、痛覚、交感神経系、自発行動・情動行動等を制御・修飾すると考えられる。

15 実施例29 in situハイブリダイゼーション法によるAQ27mRNAのラット脳における発現分布の検討

Wistarラットをネンプタール麻酔下で開腹し、左心室から0.9%食塩水を5分間潅流し、続いて4%パラホルムアルデヒド溶液を5分間潅流した。取り出した脳を同溶液中に24時間4℃で浸漬したのち、30%スクロース溶液に置換し、4℃で3日間浸漬し、解析に供する脳のサンプルを得た。

AQ27アンチセンス、センスプローブは以下の方法で調製した。

まず、プラスミドベクター p C R I I T O P O (インビトロジェン社) に 自体公知の方法でラット型AQ27c D N A を挿入した。この c D N A を、M 1 3 プライマー(インビトロジェン社)・A d v a n t a g e G C 2 ポリメラーゼ(クロンテック社)を用いた P C R に て 増幅・直鎖化し、エタノール沈 殿法により精製した。この c D N A から、D I G R N A L a b e l l i n g K I T (S P 6 / T 7) (ロッシュ社) に て S P 6 もしくは T 7 による i n v i t r o t r a n s c r i p t i o n を 行い(4 0 / L 1 スケール)、生成された D I G ラベルリボプローブをさらに 4 0 m M N a H C O 3、6 0

10

15

20

25

mMN a_2 CO $_3$ pH10. 2により400bpにアルカリ加水分解した後エタノール沈殿により精製した。精製したプロープは大塚精製水100 μ 1に溶解した。 cDNAの挿入方向から、SP6により生成されたDIGラベルリボプローブがアンチセンスプローブ、T7により生成されたDIGラベルリボプローブがセンスプローブであった。

In situハイブリダイゼーションにはフリーフローティング法を使用 した。まずクライオスタットCM3050(ライカ社)を用いて40μmの厚 さの前頭断凍結切片を作製した。つぎに切片をPBSで洗浄した後、1 µ g/ ml Proteinase Kを含む10mM Tris-HCl/1mM EDTA (pH8. 0) 処理 (37℃・15分) にてプロテアーゼ処理を行っ た。さらに、O. 25%無水酢酸を含むO. 1Mトリエタノールアミン (pH 8. 0) による処理 (室温・10分) にてアセチル化を行った後、hybri dization buffer (50%ホルムアミド, 10mM Tris -HCl pH7. 5, 1×Denhardt's solution, 20 Oμg/ml tRNA, 10%デキストラン硫酸, 600mM NaCl, O. 25% SDS, 1mM EDTA) による処理(60℃・20分) にて pre-hybridization反応を行った。Hybridizati on反応には、hybridization bufferでアンチセンスプ ローブもしくはセンスプローブを1000倍に希釈し、85℃で3分変性した 後、切片に加え60℃で12時間以上反応させた。引き続き、非特異的にhy bridizationしたプローブを洗浄するため以下の操作を行った。 1 2×SSC (SSC; 1×SSC=150mM NaCl, 15mMクエン 酸ナトリウム, pH7. 0) /50%ホルムアミド処理 (60℃・15分・2 回)、2) TNE (0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7. 6), 1 mM EDTA) 処理 (37℃·10分)、3) 20 mg/ml RNase A in TNE処理 (37℃・30分)、4) TNE処理 (3 7℃・1 0分) 、5) 2×SSC処理(6 0℃・1 5分・2回)、6) 0. 5× SSC処理 (60℃・15分・2回)。以上の操作を行った後、DIGラベル プローブを検出するための免疫組織化学を行った。まず、DIG-1(100

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 276

mM Tris-HCl pH7. 5, 150mM NaCl, 0. 1% T ween 20) で洗浄した後、1.5% Blocking reagent (ロッシュ社)を含む DIG-1による処理(37℃、1時間)にて非特異 反応のプロッキングを行い、anti-DIG fab-fragment antibody conjugated with alkaline p hosphatase (ロッシュ社)を含むDIG-1 (1:1000)を室 温で1時間反応させた。DIG-1で十分洗浄した後、DIG-3(100m M Tris-HCl pH9. 5, 100mM NaCl, 50mM Mg Cl₂) でリンスし、0. 18mg/ml 5-bromo-4-chloro -3-indolyl-phosphate (BCIP)を含むジメチルホ ルムアミド、およびO. 34mg/ml 4-nitroblue tetr azolium (NBT)を含む70%ジメチルホルムアミドを、DIGー 3 1mlにつきそれぞれ3.5mlおよび4.5ml加えた溶液によって、 4℃にて一晩発色反応を行った。適時に発色をPBS洗浄により止めた後、切 片をスライドガラスに載せ、90%グリセロールを含むPBSで封入し、光学 顕微鏡で観察した。

10

15

20

25

アンチセンスプローブにて特異的に発色していたのは、piriform cortex (梨状皮質)、cortex-amygdara transition zone (皮質扁桃移行帯)、ventral pallidum (淡蒼球)、lateral preoptic area (視索前野)、ventromedial hypothalamic nucleus (腹内側核)、zona incerta (不確帯)、posteror hypothalamic area (視床下部後核)、marginal zone median geniculate (内側膝状周辺帯)、dorsal raphe nucleus (背側縫線核)、nucleus of brachium inferior colliculus (下丘腕核)、intergeniculate leaf (膝状体間小葉)、locus coeruleus (青斑核)、central gray, alpha·beta part (中心灰白質)等であった (図51)。特にdorsal raphe

15

20

25

nucleus (背側縫線核)、locus coeruleus (青斑核)では強い発色が認められた。これらの領域ではセンスプローブによる発色は検出されなかった。

以上の結果から、新規分泌蛋白質/AQ27は視床下部で統合された情報を 大脳一脳幹に伝達する役割を担うと考えられた。具体的には、1) 摂食、2) 睡眠・覚醒、3) 痛覚、4) ストレス応答、5) 自発行動・情動行動等の制御 ・修飾作用が示唆された。

実施例30 ヒト型新規分泌蛋白質F遺伝子を導入したCHO細胞上清中のA Q27特異的活性成分の精製

まず定法により、ヒト型新規分泌蛋白質F遺伝子全長(配列番号:24)を発現ベクターpAKKO-H111に導入した。このベクターをリポフェクトアミン2000(Gibco-BRL)を用いてトランスフェクションし、一過性にCHO細胞においてヒト型新規分泌蛋白質Fを発現させ、培養上清を取得した。この培養上清中に、ベクターのみを導入したCHO細胞(mock CHO細胞)の培養上清と比較して、HEK細胞に一過性に発現させたオーファンレセプターAQ27に対して特異的な刺激活性を見出した(図52)。AQ27特異的な刺激活性の検出は、cAMPレスポンスエレメント(CRE)プロモーターの発現誘導によって産生されるレポーター遺伝子産物(ルシフェラーゼ)の発現量を指標に行った。

次に、この発現ベクターを、ジーントランスファー(和光純薬)を用いてC HOdhfr一細胞にトランスフェクションし、ヒト型AQ27リガンド遺伝 子を恒常的に発現するCHO細胞を取得した。このヒト型新規分泌蛋白質F遺 伝子発現CHO細胞を培養し、培養上清を得た。

培養上清からの精製にあたって、既知RFアミドペプチドを認識する抗体が 分泌蛋白質Fを認識し得るか、液相の競合法で検討したところ、抗RFRP-1抗体の1F3-1が分泌蛋白質FのC末端構造を認識することが判明した (図53)。

培養上清を2.4L取得し、1F3-1抗体を用いたアフィニティー精製を 行った。まず、上清を煮沸し、遠心にて析出物を取り除き、1F3-1抗体を WO 03/020932 PCT/JP02/08872

結合させたNHS-activated Sepharoseカラム(アマシャムバイオサイエンス)にアプライした。カラムを1.0M NaClを加えたPBS(Phosphate Buffered Saline)にて洗浄後、0.5MnaClを含む0.2M Glycine-HCl pH2.2で1F3-1抗体を結合させたNHS-activated Sepharoseカラムに結合した成分を溶出した。この溶出画分を、Vydac Cl8218TP5415カラムにアプライし、20~35%アセトニトリルの濃度勾配で溶出したところ、2つのピークのAQ27特異的な刺激活性が検出された(図54)。それぞれの活性ピークを μ RPC C2/C18 SC2.1/10カラムで分離したことろ、それぞれ活性ピークは2つに分かれ合計4つの活性ピーク1~4が得られた(図55および図56)。

4つの活性画分に含まれるペプチドの分子量をMALDI-TOF-MSで 測定した。図55および図56に示されるそれぞれの活性ピークに含まれるペ プチドの測定分子量とそれらに対応するヒト型AQ27リガンド遺伝子から推 測される分子量の理論値およびアミノ酸配列を図57に示す。

10

15

20

25

実施例31 長さの異なるペプチドFのAQ27発現CHO細胞株に対するc AMP産生抑制試験

AQ27を発現させたCHO細胞を、96穴プレート(ファルコン)に4×10⁴個/wellでまき、37℃、5%CO₂・95%airで一晩培養した。アッセイ用バッファーとして、Hanks'Balanced Salt Solution(ギブコ)に、終濃度0.1% ウシ血清アルブミン(BSA、シグマ)、200μM 3-isobutyl-1-methylxanthine(シグマ)、20mM HEPES(pH7.4) (ギブコ)を加えたものを調製した。試料希釈用バッファーとしてアッセイ用バッファーに終濃度2μM フォルスコリンを添加したものを作成、これを用い図58に示した試料ペプチドを、2×10⁻⁶M、2×10⁻⁷M、2×10⁻⁸M、2×10⁻⁹M、2×10⁻¹⁰M、2×10⁻¹¹Mに希釈した。一晩培養した細胞は、アッセイ用バッファー150μ1で二回洗浄後交換して30分、37℃、100% airで培養し、同様に2回洗浄して、アッセイ用バッファー50μ1、試料溶液5

 $0\mu1$ を添加し、攪拌した後30分、37℃、100% airで培養した。 細胞内 c AMP量を、 c AMP—S c r e e n TM System (ABI) を用い、本キットのプロトコールに従い測定した。Maximam levelのc AMP量と各サンプルを添加した時の c AMP量の差を算出して、フォルスコリンによる c AMP産生促進量に対する百分率を算出し、これを c AMPの産生の抑制率とした(図59)。図58に各試料のE C_{50} 値を示す。 実施例32 ヒト型新規分泌蛋白質Fのラットコルチコステロンの分泌刺激活性

AQ27受容体がラット副腎で高い発現をしていることから、副腎ホルモンの分泌に作用する可能性があるため、図58に記載のAQ27L-43をラットに投与して副腎皮質ホルモンに対する影響を調べた。8週齢のオスWistarラットを軽く固定し尾静脈からAQ27L-43を生理食塩水に溶解し0.5mg/ラットの濃度で投与し30分後に断頭により採血を行った。またコントロールとして生理食塩水を投与したラットから採血した。これらの血清成分をラットコルチコステロン測定キット(Amersham社)を用いて測定したところAQ27投与ラットで血中コルチコステロンの上昇が観察できた。

産業上の利用可能性

本発明の新規分泌蛋白質およびそのDNAは、例えば、本発明の新規分泌蛋 20 白質の機能不全に関連する疾患などに対する予防・治療薬などとして有用であ る。

さらに、本発明の新規分泌蛋白質は、本発明の新規分泌蛋白質の機能を促進 または阻害する化合物のスクリーニング等にも有用である。

本発明のDNAは、本発明の新規分泌蛋白質の発現を促進または阻害する化 25 合物のスクリーニング等にも有用である。

請求の範囲

- 1. 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 2. 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 3. 請求項1記載の分泌蛋白質の部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 10 4. 請求項1記載の分泌蛋白質の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 5. 配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項4記載の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 15 6. 配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 7. 請求項1記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリ ヌクレオチド。
- 8. 配列番号: 7で表わされる塩基配列からなる請求項7記載のポリヌクレオ 20 チド。
 - 9. 請求項3記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 10. 請求項4記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 25 11.配列番号:8で表わされる塩基配列からなる請求項10記載のポリヌクレオチド。
 - 12. 請求項7~11のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
 - 13. 請求項12記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

- 14. 請求項13記載の形質転換体を培養し、請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 5 15. 請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、 またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
 - 1 6. 請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、 またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中 和抗体である請求項15記載の抗体。
- 10 17. 請求項15記載の抗体を含有してなる医薬。
 - 18. 請求項15記載の抗体を含有してなる診断薬。
 - 19. 請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 20. 請求項7~11のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医 薬。
 - 21. 請求項7~11のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤。
 - 22. 請求項7~11のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
- 20 23. 請求項22記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
 - 24. 請求項22記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。
 - 25. 請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま
- 25 たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
 - 26. 請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、 またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴と する請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、

そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化 合物またはその塩のスクリーニング用キット。

- 27. 請求項25記載のスクリーニング方法または請求項26記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペ
- 5 プチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまた はその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。
 - 28. 請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 29. 請求項7~11のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 30. 請求項7~11のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを 特徴とする請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進また は阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
 - 31. 請求項29記載のスクリーニング方法または請求項30記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。
 - 3 2. 請求項1記載の分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 25 33. 配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~112番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 34. 配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~112番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその

塩。

5

15

- 35. 配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~37番目のアミノ酸配列または第40番目~55番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 36. 配列番号:3で表わされるアミノ酸配列の第22番目~37番目のアミノ酸配列または第40番目~55番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 37. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチドの部分ペ 10 プチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 38. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチドの前駆体 蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 39. 配列番号:3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の アミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項38記載の前駆体蛋白質、そ のアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 40. 配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 41. 請求項33記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 20 42. 配列番号:9で表わされる塩基配列の第64番目~336番目の塩基配列からなる請求項41記載のポリヌクレオチド。
 - 43. 請求項35記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 44. 配列番号:9で表わされる塩基配列の第64番目~111番目の塩基配 25 列または第118番目~165番目の塩基配列からなる請求項43記載のポリ ヌクレオチド。
 - 45. 請求項37記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 46. 請求項38記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有す

るポリヌクレオチド。

- 47. 配列番号: 9で表わされる塩基配列からなる請求項46記載のポリヌクレオチド。
- - 49. 請求項48記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
 - 50. 請求項49記載の形質転換体を培養し、請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35
- 10 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミ ドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
 - 51. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
- 15 52. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項51記載の抗体。
 - 53. 請求項51記載の抗体を含有してなる医薬。
 - 54. 請求項51記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 20 55. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 5 6. 請求項41~47のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる 医薬。
- 25 57. 請求項41~47のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる 診断剤。
 - 58. 請求項41~47のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
 - 59. 請求項58記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

61. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項33記載の分泌蛋白質または請

60. 請求項58記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。

- 5 求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、または そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化 合物またはその塩のスクリーニング方法。
 - 62. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

10

25

- 63. 請求項61記載のスクリーニング方法または請求項62記載のスクリー ニング用キットを用いて得られうる、請求項33記載の分泌蛋白質または請求 項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそ のアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合 物またはその塩。
- 64. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部 20 分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステル またはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる 医薬。
 - 65. 請求項41~47のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを 特徴とする請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、そ の部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエス テルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリー ニング方法。
 - 66. 請求項41~47のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有すること を特徴とする請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、

その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

- 67. 請求項65記載のスクリーニング方法または請求項66記載のスクリー ニング用キットを用いて得られうる、請求項33記載の分泌蛋白質または請求 項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 68. 請求項33記載の分泌蛋白質または請求項35記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
 - 69. 配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~234番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

15

- 70. 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~234番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその 塩。
- 71.配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~21番目のアミノ酸配列、第26番目~58番目のアミノ酸配列、第60番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~107番目のアミノ酸配列、第110番目~187番目のアミノ酸配列または第190番目~234番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 72. 配列番号:4で表わされるアミノ酸配列の第15番目~21番目のアミノ酸配列、第26番目~58番目のアミノ酸配列、第60番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~107番目のアミノ酸配列、第110番目~187番目のアミノ酸配列または第190番目~234番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 73. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 74. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチドの前駆体 蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 5 75.配列番号:4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の アミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項74記載の前駆体蛋白質、そ のアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 76. 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 10 77. 請求項69記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有する ポリヌクレオチド。
 - 78. 配列番号:10で表わされる塩基配列の第43番目~702番目の塩基 配列からなる請求項77記載のポリヌクレオチド。
- 79. 請求項71記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポ 15 リヌクレオチド。
 - 80. 配列番号:10で表わされる塩基配列の第43番目~63番目の塩基配列、第76番目~174番目の塩基配列、第178番目~264番目の塩基配列、第268番目~321番目の塩基配列、第328番目~561番目の塩基配列または第568番目~702番目の塩基配列からなる請求項79記載のポリヌクレオチド。
 - 81. 請求項73記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 82. 請求項74記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 25 83. 配列番号: 10で表わされる塩基配列からなる請求項82記載のポリヌ クレオチド。
 - 84. 請求項77~83のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換 えベクター。
 - 85. 請求項84記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

- 86. 請求項85記載の形質転換体を培養し、請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 87. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
- 88. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項87記載の抗体。
 - 89. 請求項87記載の抗体を含有してなる医薬。

- 90. 請求項87記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 91. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 92. 請求項77~83のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる 医薬。
- 93. 請求項77~83のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる 20 診断剤。
 - 94. 請求項77~83のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基 配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
 - 95. 請求項94記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
 - 96. 請求項94記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。
- 97. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化

10

15

20

25

合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 98. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 99. 請求項97記載のスクリーニング方法または請求項98記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 100. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してな る医薬。
- 101. 請求項77~83のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 102. 請求項77~83のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 103. 請求項101記載のスクリーニング方法または請求項102記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま

たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

104. 請求項69記載の分泌蛋白質または請求項71記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 105. 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~166番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 10 106. 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~166番目の アミノ酸配列をからなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたは その塩。
 - 107. 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~85番目のアミノ酸配列、第86番目~114番目のアミノ酸配列または第115番目~1
- 15 66番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。108.配列番号:5で表わされるアミノ酸配列の第25番目~85番目のアミノ酸配列、第86番目~114番目のアミノ酸配列または第115番目~166番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 109. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 110. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 25 111. 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一 のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項110記載の前駆体蛋白質、 そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 112. 配列番号:5で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

110 競争を10に記典の八沙を力所され、 サナスポリッカレナエサナ会

113. 請求項105記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

PCT/JP02/08872

- 114. 配列番号:11で表わされる塩基配列の第73番目~498番目の塩 基配列からなる請求項113記載のポリヌクレオチド。
- 5 115. 請求項107記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 116. 配列番号:11で表わされる塩基配列の第73番目~255番目の塩 基配列、第256番目~342番目または第343番目~498番目の塩基配 列からなる請求項115記載のポリヌクレオチド。
- 10 117. 請求項109記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含 有するポリヌクレオチド。
 - 118. 請求項110記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 119. 配列番号: 11で表わされる塩基配列からなる請求項118記載のポ 15 リヌクレオチド。
 - 120. 請求項113~119のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
 - 121. 請求項120記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
- 122. 請求項121記載の形質転換体を培養し、請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
 - 123. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩に対する抗体。

25

124. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項123記載の

抗体。

- 125. 請求項123記載の抗体を含有してなる医薬。
- 126. 請求項123記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 127. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、
- 5 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 128. 請求項113~119のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 129. 請求項113~119のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有し 10 てなる診断剤。
 - 130. 請求項113~119のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
 - 131. 請求項130記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 15 132. 請求項130記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤。
- 133. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項105記載の分泌蛋白質 20 または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 134.請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする請求項97記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
 - 135. 請求項133記載のスクリーニング方法または請求項134記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項105記載の分泌蛋白質ま

たは請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、 またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害 する化合物またはその塩。

136. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

137. 請求項113~119のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10

15

20

25

138. 請求項113~119のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

139. 請求項137記載のスクリーニング方法または請求項138記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

140. 請求項105記載の分泌蛋白質または請求項107記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

141. 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~241番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 142. 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~241番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 143.配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~58番目のアミノ酸配列、第63番目~202番目のアミノ酸配列または第205番目~241番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。144.配列番号:6で表わされるアミノ酸配列の第19番目~58番目のアミノ酸配列、第63番目~202番目のアミノ酸配列または第205番目~241番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 145. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 146. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチドの15 前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 147.配列番号:6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項146記載の前駆体蛋白質またはその塩。
- 148. 配列番号:6で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、その 20 アミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 149. 請求項141記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 150. 配列番号:12で表わされる塩基配列の第55番目~723番目の塩 基配列からなる請求項149記載のポリヌクレオチド。
- 25 151. 請求項143記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 152. 配列番号:12で表わされる塩基配列の第55番目~174番目の塩 基配列、第187番目~606番目または第613番目~723番目の塩基配 列からなる請求項151記載のポリヌクレオチド。

- 153. 請求項145記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含 有するポリヌクレオチド。
- 154. 請求項146記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 5 155. 配列番号:12で表わされる塩基配列からなる請求項154記載のポリヌクレオチド。
 - 156. 請求項149~155のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
 - 157. 請求項156記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
- 158. 請求項157記載の形質転換体を培養し、請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 15 159. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩に対する抗体。
 - 160. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項159記載の 抗体。
 - 161. 請求項159記載の抗体を含有してなる医薬。

- 162. 請求項159記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 163. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、
- 25 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 164. 請求項149~155のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
 - 165. 請求項149~155のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有し

てなる診断剤。

5

166. 請求項149~155のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。

167. 請求項166記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

168. 請求項166記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。

169. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

170. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、

- 15 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 20 171. 請求項169記載のスクリーニング方法または請求項170記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 25 172. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有し てなる医薬。
 - 173. 請求項149~155のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いる

- ことを特徴とする請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 5 174. 請求項149~155のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 10 175. 請求項173記載のスクリーニング方法または請求項174記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 15 176. 請求項141記載の分泌蛋白質または請求項143記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 177. 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~136番目 20 のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを 特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 178. 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第19番目~136番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 25 179. 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目~88番目のアミノ酸配列、第80番目~88番目のアミノ酸配列、第91番目~133番目のアミノ酸配列または第127番目~133番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 180.配列番号:23で表わされるアミノ酸配列の第26番目~88番目のアミノ酸配列、第80番目~88番目のアミノ酸配列、第90番目~133番目のアミノ酸配列、第91番目~133番目のアミノ酸配列、第93番目~133番目のアミノ酸配列、第104番目~133番目のアミノ酸配列、第108番目~133番目のアミノ酸配列、第109番目~133番目のアミノ酸配列、第115番目~133番目のアミノ酸配列、第115番目~133番目のアミノ酸配列、第115番目~133番目のアミノ酸配列、第124番目~133番目のアミノ酸配列、第124番目~133番目のアミノ酸配列、第124番目~133番目のアミノ酸配列、第124番目~133番目のアミノ酸配列、第126番目~133番目または第127番目~133番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 181. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 182. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 18 3. 配列番号: 23で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項182記載の前駆体蛋白質またはその塩。
 - 184. 配列番号:23で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 20 185. 請求項177記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有 するポリヌクレオチド。
 - 186. 配列番号:24で表わされる塩基配列の第55番目~408番目の塩 基配列からなる請求項185記載のポリヌクレオチド。
- 187. 請求項179記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有す 25 るポリヌクレオチド。
 - 188.配列番号:24で表わされる塩基配列の第76番目~264番目の塩 基配列、第238番目~264番目、第271番目~399番目または第37 9番目~399番目の塩基配列からなる請求項187記載のポリヌクレオチド。 189.請求項181記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含

20

25

有するポリヌクレオチド。

- 190. 請求項183記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 191.配列番号:24で表わされる塩基配列からなる請求項190記載のポリヌクレオチド。
- 192. 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- 193. 請求項192記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
- 194. 請求項193記載の形質転換体を培養し、請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
 - 195. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、
- 15 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
 - 196. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項195記載の抗体。
 - 197. 請求項195記載の抗体を含有してなる医薬。
 - 198. 請求項195記載の抗体を含有してなる診断薬。
 - 199. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 200. 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
 - 201. 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。

202. 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。

203. 請求項202記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

5 204. 請求項202記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤。

205. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10

206. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

207. 請求項205記載のスクリーニング方法または請求項206記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。

208. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

209. 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いる ことを特徴とする請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペ プチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしく はそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩 のスクリーニング方法。

210. 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

211. 請求項209記載のスクリーニング方法または請求項210記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

212. 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

213. 配列番号: 27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

20

214. 配列番号: 27で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

215. 配列番号:27で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番 目のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

216. 配列番号: 27で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番目のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列からなるペ

プチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 217. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチドの 部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 218. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 219. 配列番号:27で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項218記載の前駆体蛋白質またはその塩。
- 2 2 0. 配列番号: 2 7 で表わされるアミノ酸配列からなる請求項 2 1 9 記載 の前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 221. 請求項213記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 222. 配列番号: 28で表わされる塩基配列の第52番目~372番目の塩 基配列からなる請求項221記載のポリヌクレオチド。
- 223. 請求項215記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 224. 配列番号: 28で表わされる塩基配列の第343番目~366番目の 塩基配列または第346番目~366番目の塩基配列からなる請求項223記 載のポリヌクレオチド。
- 20 225. 請求項217記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含 有するポリヌクレオチド。
 - 226. 請求項219記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 227. 配列番号: 28で表わされる塩基配列からなる請求項226記載のポ 25 リヌクレオチド。
 - 228. 請求項221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有す ・る組換えベクター。
 - 229. 請求項228記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
 - 230. 請求項229記載の形質転換体を培養し、請求項213記載の分泌蛋

白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体 蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項213記載の分泌蛋白質または 請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

- 5 231. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩に対する抗体。
- 232. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項231記載の 抗体。
 - 233. 請求項231記載の抗体を含有してなる医薬。
 - 234. 請求項231記載の抗体を含有してなる診断薬。
 - 235. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、
- 15 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 236. 請求項221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 237. 請求項221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有し20 てなる診断剤。
 - 238. 請求項221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
 - 239. 請求項238記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 25 240. 請求項238記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤。
 - 241. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項213記載の分泌蛋白質

または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白 質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または 阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

242. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

- 10 243. 請求項241記載のスクリーニング方法または請求項242記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。
- 15 244.請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 245. 請求項221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いる ことを特徴とする請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしく はそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- - 247. 請求項245記載のスクリーニング方法または請求項246記載のス

クリーニング用キットを用いて得られうる、請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

5 248. 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

249. (i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

250. 請求項249記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するC蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

25

251. 請求項249記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペ

プチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と (ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

5

10

15

20

252. (i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

253. 請求項252記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

254. 請求項252記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合

10

25

物またはその塩を含有してなる医薬。

255. (i) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:4'6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

256. 請求項255記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

257. 請求項255記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

258. (i) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくは

そのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

5

20

259.請求項258記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

260. 請求項258記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

261. 該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する細胞を用い、該細胞内Ca²⁺遊離または細胞内cAMP生成を指標とする請求項249、252、255または258記載のスクリーニング方法。262. 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第18番目~124番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 263. 配列番号: 38 で表わされるアミノ酸配列の第18 番目 \sim 124 番目のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 264.配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番 5 目のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列と同一もし くは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチド、その アミドもしくはそのエステルまたはその塩。
 - 265. 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列の第115番目~122番目のアミノ酸配列または第116番目~122番目のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 266. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチドの部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 267. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチドの 前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 268. 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項267記載の前駆体蛋白質またはその塩。
 - 269. 配列番号:38で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 20 270. 請求項262記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有 するポリヌクレオチド。
 - 271. 配列番号:39で表わされる塩基配列の第52番目~372番目の塩 基配列からなる請求項270記載のポリヌクレオチド。
- 272. 請求項264記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有す 25 るポリヌクレオチド。
 - 273. 配列番号:39で表わされる塩基配列の第343番目~366番目の塩基配列または第346番目~366番目の塩基配列からなる請求項272記載のポリヌクレオチド。
 - 274. 請求項265記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含

20

有するポリヌクレオチド。

- 275. 請求項267記載の前駆体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 276.配列番号:39で表わされる塩基配列からなる請求項275記載のポリヌクレオチド。
 - 277. 請求項270~276のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
 - 278. 請求項277記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
- 279. 請求項278記載の形質転換体を培養し、請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
 - 280. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、
- 15 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
 - 281. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項280記載の抗体。
 - 282. 請求項280記載の抗体を含有してなる医薬。
 - 283. 請求項280記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 284. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩を含有してなる医薬。
 - 285. 請求項270~276のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
 - 286. 請求項270~276のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。

15

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

287. 請求項270~276のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。

288. 請求項287記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

5 289. 請求項287記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤。

290. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

291. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

292. 請求項290記載のスクリーニング方法または請求項291記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。

293. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

294.請求項270~276のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いる ことを特徴とする請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペ

プチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしく はそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩 のスクリーニング方法。

295. 請求項270~276のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有す ることを特徴とする請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載の 5 ペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもし くはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその 塩のスクリーニング用キット。

296. 請求項294記載のスクリーニング方法または請求項295記載のス 10 クリーニング用キットを用いて得られうる、請求項262記載の分泌蛋白質ま たは請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、 またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害 する化合物またはその塩。

297. 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ 15 ステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有し てなる医薬。

298. 配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~134番目 のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを 特徴とする分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

20

299. 配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第18番目~131番目 のアミノ酸配列からなる分泌蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたは その塩。

300. 配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第125番目~131番 目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有すること 25 を特徴とするペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

301. 配列番号:42で表わされるアミノ酸配列の第125番目~131番 目のアミノ酸配列または第124番目~131番目のアミノ酸配列からなるペ プチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

- 302. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチドの 部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 303. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチドの前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 5 304. 配列番号:42で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項303記載の前駆体蛋白質またはその塩。
 - 305. 配列番号: 42で表わされるアミノ酸配列からなる前駆体蛋白質、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 10 306. 請求項298記載の分泌蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有 するポリヌクレオチド。
 - 307. 配列番号:43で表わされる塩基配列の第52番目~402番目の塩 基配列からなる請求項306記載のポリヌクレオチド。
- 308. 請求項300記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有す 15 るポリヌクレオチド。
 - 309. 配列番号:43で表わされる塩基配列の第373番目~393番目の塩基配列または第370番目~393番目の塩基配列からなる請求項308記載のポリヌクレオチド。
- 310. 請求項301記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含 20 有するポリヌクレオチド。
 - 311. 請求項303記載の前駆体蛋白質をコードするポリダクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 312. 配列番号: 43で表わされる塩基配列からなる請求項311記載のポリヌクレオチド。
- **25** 313. 請求項306~312のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
 - 314. 請求項313記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
 - 315. 請求項314記載の形質転換体を培養し、請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体

蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項298記載の分泌蛋白質または 請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

- 316. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、
- 5 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
 - 317. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項316記載の
- 10 抗体。

- 318. 請求項316記載の抗体を含有してなる医薬。
- 319. 請求項316記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 320. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。
- 321. 請求項306~312のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 322. 請求項306~312のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。
- 20 3 2 3. 請求項3 0 6 ~ 3 1 2 のいずれかに記載のポリヌクレオチドと相補的 な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
 - 324. 請求項323記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 325. 請求項323記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 25 断剤。
 - 326. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項298記載の分泌蛋白質 または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白

25

質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または 阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

327. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエ ステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求項298記載の分泌蛋白 質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進また は阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

328. 請求項326記載のスクリーニング方法または請求項327記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。

329. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、

15 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

330. 請求項306~312のいずれかに記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

331. 請求項306~312のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

332. 請求項330記載のスクリーニング方法または請求項331記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項298記載の分泌蛋白質ま

たは請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

333. 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、 その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

334. (i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、

15 またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

20 335. 請求項334記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

336. 請求項334記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまた

20

はその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性 を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 5 337. (i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項262記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いる ことを特徴とする、(i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と
 - 338. 請求項337記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

339. 請求項337記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

340. (i)請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と (ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いることを特徴とする、(i)請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と (ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

5

10

341. 請求項340記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

20 342. 請求項340記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i)請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:31、配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

343. (i) 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表

20

25

わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを用いる ことを特徴とする、(i)請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300 記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミ ドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号: 35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を 含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

344. 請求項343記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、(i) 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii)配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

345. 請求項343記載のスクリーニング方法を用いて得られうる(i) 請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(ii) 配列番号:33または配列番号:35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

346. 該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する細胞を用い、該細胞内Ca²⁺遊離または細胞内cAMP生成を指標とする請求項334、337、340または343記載のスクリーニング方法。347. 配列番号:44または配列番号:46で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩。

348. 配列番号: 44または配列番号: 46で表わされるアミノ酸配列から

なるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

- 349.請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分 ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- 350. 配列番号: 45または配列番号: 47で表わされる塩基配列からなる 請求項349記載のポリヌクレオチド。
- 351. 請求項349記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- 352. 請求項351記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
- 353. 請求項352記載の形質転換体を培養し、請求項347記載のG蛋白 質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項347記載 のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
- 354. 請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプ チドまたはその塩に対する抗体。
 - 355. 請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプ チドまたはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項354記載の抗
- 体。 15

5

- 356. 請求項354記載の抗体を含有してなる医薬。
- 357. 請求項354記載の抗体を含有してなる診断薬。
- 358. 請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプ チドまたはその塩を含有してなる医薬。
- 359. 請求項349記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。 20
 - 360. 請求項349記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。
 - 361. 請求項349記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその 一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド。
- 362. 請求項361記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医 薬。 25
 - 363. 請求項361記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる診 断剤。
 - 364. 請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプ チドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項347記載のG蛋白質共役

型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

365. 請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

366. 請求項364記載のスクリーニング方法または請求項365記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩。

10

367. 請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

368. 請求項349記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求 項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそ の塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。 369. 請求項349記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする請 求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたは その塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キ ット。

370. 請求項368記載のスクリーニング方法または請求項369記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

25 371. 請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。372. ホルモン分泌調節剤、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤である請求項197、199、200、203,208、212、233、235、23

6、239、244、248、251、254、257、282、284、288、293、297、317、320、322、324、329、333、336、342、356、359、362、367または371記載の医薬。373. プロラクチン分泌調節剤である請求項197、199、200、203、208、212、233、235、236、239、244、248、251、257、282、284、285、288、293、297、318、320、321、324、329、333、339または345記載の医薬。374、哺乳動物に対して、

5

(i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その 10 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩、(ii) 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレ オチド、(iii)請求項195記載の抗体、(iv)請求項202記載のアンチセ ンスポリヌクレオチド、(v)請求項207記載の化合物またはその塩、(vi) 請求項211記載の化合物またはその塩、(vii)請求項213記載の分泌蛋白 質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 15 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、 (viii) 請求項 221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(ix)請求項231記 載の抗体、(x) 請求項238記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi) 請 求項243記載の化合物またはその塩、(xii) 請求項247記載の化合物また はその塩、(xiii)請求項250記載の化合物またはその塩、(xiv)請求項2 20 56記載の化合物またはその塩、(xv) 請求項262記載の分泌蛋白質または 請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xvi) 請求項270~2 76のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xvii)請求項280記載の抗体、 (xviii) 請求項287記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xix) 請求項 25 292記載の化合物またはその塩、(xx)請求項296記載の化合物またはそ の塩、(xxi)請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチ ド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそ のエステルまたはその塩、(xxii)請求項306~312のいずれかに記載の

10

15

20

25

ポリヌクレオチド、(xxiii)請求項316記載の抗体、(xxiv)請求項323 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxv)請求項328記載の化合物また はその塩、(xxvi)請求項332記載の化合物またはその塩、(xxvii)請求項 335記載の化合物またはその塩、(xxviii)請求項341記載の化合物また はその塩、(xxix)請求項347記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、そ の部分ペプチドまたはその塩、(xxxx)請求項349記載のポリヌクレオチド、 (xxxi)請求項354記載の抗体、(xxxx)請求項361記載のアンチセンス ポリヌクレオチド、(xxxii)請求項366記載の化合物、または(xxxiv)請 求項370記載の化合物の有効量を投与することを特徴とするホルモン分泌調 節、摂食、睡眠、覚醒、痛覚、ストレス応答、自発行動または情動行動の調節 方法。

375. 哺乳動物に対して

(i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ ルまたはその塩、(ii)請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレ オチド、(iii)請求項195記載の抗体、(iv)請求項202記載のアンチセ ンスポリヌクレオチド、(v) 請求項207記載の化合物またはその塩、(vi) 請求項211記載の化合物またはその塩、(vii)請求項213記載の分泌蛋白 質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(viii)請求項 221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(ix) 請求項231記 載の抗体、(x) 請求項238記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi) 請 求項243記載の化合物またはその塩、(xii)請求項247記載の化合物また はその塩、(xiii)請求項253記載の化合物またはその塩、(xiv)請求項2 59記載の化合物またはその塩、(xv) 請求項262記載の分泌蛋白質または 請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xvi) 請求項270~2 76のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xvii) 請求項280記載の抗体、 (xviii) 請求項287記載のアンチセンスポリヌクレオチド、 (xix) 請求項

292記載の化合物またはその塩、(xx)請求項296記載の化合物またはそ の塩、(xxi)請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチ ド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそ のエステルまたはその塩、(xxii)請求項306~312のいずれかに記載の ポリヌクレオチド、(xxiii)請求項316記載の抗体、(xxiv)請求項323 記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxv)請求項328記載の化合物また はその塩、(xxvi)請求項332記載の化合物またはその塩、(xxvii)請求項 338記載の化合物またはその塩、または (xxviii) 請求項344記載の化合

PCT/JP02/08872

10 法。

20

25

5

376. ホルモン分泌調節剤、摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調 節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤を製造する ための

物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするプロラクチン分泌調節方

(i)請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その 部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステ 15 ルまたはその塩、(ii)請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレ オチド、(iii)請求項195記載の抗体、(iv)請求項202記載のアンチセ ンスポリヌクレオチド、(v)請求項207記載の化合物またはその塩、(vi) 請求項211記載の化合物またはその塩、(vii)請求項213記載の分泌蛋白 質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋 白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、 (viii) 請求項 221~227のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(ix)請求項231記 載の抗体、(x)請求項238記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi)請 求項243記載の化合物またはその塩、(xii) 請求項247記載の化合物また はその塩、(xiii)請求項250記載の化合物またはその塩、(xiv)請求項2 56記載の化合物またはその塩、 (xv) 請求項262記載の分泌蛋白質または 請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xvi)請求項270~2 76のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xvii)請求項280記載の抗体、

10

20

25

15 377. プロラクチン分泌調節剤を製造するための

(i) 請求項177記載の分泌蛋白質または請求項179記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 請求項185~191のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(iii) 請求項195記載の抗体、(iv) 請求項202記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(v) 請求項207記載の化合物またはその塩、(vi) 請求項213記載の分泌蛋白質または請求項215記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(viii) 請求項231記載の抗体、(x) 請求項238記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi) 請求項213記載の抗体、(x) 請求項238記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xi) 請求項243記載の化合物またはその塩、(xii) 請求項247記載の化合物またはその塩、(xiii) 請求項247記載の化合物またはその塩、(xiii) 請求項259記載の化合物またはその塩、(xiv) 請求項259記載の化合物またはその塩、(xv) 請求項262記載の分泌蛋白質または請求項264記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、ま

10

20

25

たはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xvi)請求項270~276のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xvii)請求項280記載の抗体、(xviii)請求項287記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xix)請求項292記載の化合物またはその塩、(xx)請求項296記載の化合物またはその塩、(xxi)請求項296記載の公合物またはその塩、(xxi)請求項298記載の分泌蛋白質または請求項300記載のペプチド、その部分ペプチドまたはその前駆体蛋白質、またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(xxii)請求項306~312のいずれかに記載のポリヌクレオチド、(xxiii)請求項316記載の抗体、(xxiv)請求項323記載のアンチセンスポリヌクレオチド、(xxv)請求項328記載の化合物またはその塩、(xxvii)請求項3328記載の化合物またはその塩、(xxvii)請求項338記載の化合物またはその塩、(xxvii)請求項3344記載の化合物またはその塩の使用。

378. 配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、 覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤。

379. 配列番号: 31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる

摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自 発行動調節剤または情動行動調節剤。

380.配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤。

381. 配列番号: 31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同

10

15

一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤。

382.配列番号:31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤。

383. 配列番号: 31で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる摂食調節剤、睡眠調節剤、覚醒調節剤、痛覚調節剤、ストレス応答調節剤、自発行動調節剤または情動行動調節剤。

120 240 303 180 300 aiggggccig gacgatgcci ccigacggcc iigiigciic iggccciggc gccaccgccg gaageeteee agtactgegg eegeettgaa tactggaace cagacaacaa gtgetgeage agcigcige aacgcitegg geegeeeee igeeeggaae igleeagiei ggegteacaa cccigicic gcciccigga igagciggag gigciggaag agcigatigi acigciggac cetgageetg ggecaggigg gggtatggee caiggeacta etegacaeet ggeegeaaga

2/59

図 2

 Met Gly Pro
 Gly Arg Cys Leu Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu 5
 10
 15

 Ala Pro Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp 20
 25
 30

 Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro 35
 40
 45

 Pro Pro Pro Cys Pro Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg 50
 55
 60

 Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val Leu Glu Glu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp 65
 70
 75
 80

 Pro Glu Pro Gly Pro Gly Gly Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His 85
 90
 95

 Leu Ala Ala Arg Bnd 100
 8nd 100
 8nd 100
 8nd 100

WO 03/020932

図 3

240 339. 9 120 180 300 atgiggecee gaaaactege ciggatitig geggeggeeg egtiggegee gggategtee agegggaigt ctagaatgte gtegteegge ttggageagg egtteteetg ggggegaage aggggggtte tigtggggte acigggteit gateegegg agiggggtag gaatagagee ctgagggaca gggactatgg cgacgcgggg gtgggaggta cagagagggg tgtcgagcct ggagcagggc tatggcaggg acactcactg gggcatgggc agcgacaggc gaagaaggtt cagggccaga tgcccagica icgaiiicaa iicagiiaa

4/59

図 4

Met Trp Pro Arg Lys Leu Ala Trp Ile Leu Ala Ala Ala Ala Leu Ala 15 10 5 Pro Gly Ser Ser Ser Gly Met Ser Arg Met Ser Ser Ser Gly Leu Glu 25 Gin Ala Phe Ser Trp Gly Arg Ser Arg Gly Val Leu Val Gly Ser Leu 40 35 Gly Leu Asp Pro Arg Glu Trp Gly Arg Asn Arg Ala Leu Arg Asp Arg 55 Asp Tyr Gly Asp Ala Gly Val Gly Gly Thr Glu Arg Gly Val Glu Pro 75 65 70 Gly Ala Gly Leu Trp Gln Gly His Ser Leu Gly His Gly Gln Arg Gln 90 85 Ala Lys Lys Val Gln Gly Gln Met Pro Ser His Arg Phe Gln Phe Ser 110 100 105 End

5/59

図 5

480 240 360420 540 -300 900 660 atgeggege cactetgeet geteetgete gtegeceaeg eegtggaeat getegeeetg aaccgaagga agaagcaagi gggcaciggc cigggggggca acigcacagg cigtaicaic cgeggeeagg aggteacag gigeaaaaa igiggggeea eiigigagag eigetieage agaacggcig itccaccigc cagcagaggc iciiccigit caiccgccgg gaaggcatee gecagtaegg caagtgeetg caegaetgte eccetgggta etteggeate caggactict gcatccggtg caagaggcag tittactigt acaaggggaa gtgtctgccc accigceege egggeaciti ggeceaceag aacacaeggg agigecaggg ggagigigaa gccaggigc iiicigagic aaggaaaigi cccaiccaga ggcccigccc aggagagag agceceggie agaagaaggg caggaaggae eggegeetae geaaggaeag gaageiggae cgcaggctgg acgtgaggcc gcgccagccc ggcctgcagc cctga geteagagg

6/59

.Me t	Arg	Ala	Pro	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	His	A-l a		Asp
				5					10					15	
Met	Leu	Ala	Leu	Asn	Arg	Arg	Lys	Lys	Gln	Val	Gly	Thr	Gly	Leu	Gly
			20					25					30		
Gly	Asn	Cys	Thr	Gly	Cys	He	Ile	Cys	Ser	Glu	Glu	Asn	Gly	Cys	Ser
		35					40					45			
Thr	Cys	Gln	Gln	Arg	Leu	Phe	Leu	Phe	Ile	Arg	Arg	Glu	Gly	lle	Arg
	50			•		55					60				
Gln	Tyr	Gly	Lys	Cys	Leu	His	Asp	Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Phe	Gly	He
65					70					75					80
Arg	Gly	Gln	Glu	Val	Asn	Arg	Cys	Lys		Cys	Gly	Ala	Thr		Glu
				85					90		•			95	
Ser	Cys	Phe		Gln	Asp	Phe	Cys		Arg	Cys	Lys	Arg		Phe	Tyr
			100					105					110		
Leu	Tyr		Gly	Lys	Cys	Leu		Thr	Cys	Pro	Pro		Thr	Leu-	Ala
		115			•		120					125		_	
His	Gln	Asn	Thr	Arg	Glu	-	Gln	Gly	Glu	Cys		Leu	Gly	Pro	Trp
	130					135	•			_	140	_		_	
	Gly	Trp	Ser	Pro		Thr	His	Asn	Gly		Thr	Cys	Gly	Ser	
145					150					155					160
Trp	Gly	Leu	Glu		Arg	Val	Arg	Glu		Gly	Arg	Ala	Gly		Glu
				165				_	170	_			_	175	
Glu	Ala	Ala		Cys	Gln	Val	Leu		Glu	Ser	Arg	Lys		Pro	He
	_	_	180	_		4.		185	_				190		
Gln	Arg		Cys	Pro	Gly	Glu	_	Ser	Pro	Gly	GIn		Lys	Gly	Arg
_		195		_		_	200			-		205			
Lys	Asp	Arg	Arg	Pro	Arg		Asp	Arg	Lys:	Deu		Arg	Arg	Leu	Asp
	210				_	215					220				
•	Arg	Pro	Arg	Gln		Gly	Leu	GIN	Pro						
225					230					235			•		

501				ದ	accigggggi giggacagig a	acctgggggt	
48(cctcactigg	tcctaccatc	aactecetee	gecagggag	aaggeetace tgegggtgea gecaggggag aacteetee teetaceale eeteacttgg	aaggcctacc	
42(ccacaaggtc	aggcccggca	agcgacggca	catcgacttc	ggcacctacg agigccgcgt catcgactic agcgacggca aggcccggca ccacaaggtc	ggcacctacg	
36(cacggacgaa	gggtgaagcc	cgccigiccc	ccacaagctg	giggigggea gcaacatete ceacaageig egeeigieee gggigaagee caeggaegaa	giggigggca	
30(ggtggtcaag	cctcgaacca	caggrgtggg	gacegacaag	gtacggagec accgggactg gaccgacaag caggcgtggg cetegaacea ggtggteaag	gtacggagcc	
24(gtggtggtat	tggagatcca	tectactege	ossotosso	geetgeteet teegeggeag eggeteeece teetactege iggagateea giggiggial	gccigcicci	
18	cgtggagatg	cgggcgagga	acagcacgga	ccatgacatg	gecetgitea cagagacace ceatgacatg acageaegga egggegagga egtggagatg	gccctgttca	
12	ctccggccac	acaaccacgt	gegreetggg	cgccggccac	cteggeggeg ceaegegee egecageeae gegeeetggg acaaceaegt eteeggeeae	goggoggoto	
9	tit tee tgeaa	acciggcaci	gccciccact	agcgctgggc	atgggggccc cgctcgccgt agcgctgggc gcctccact acctggcact titcctgcaa	atggggccc	

8/59

Met	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Yal	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	His	Tyr	Leu	Ala
				5			•		10					15	
Leu	Phe	Leu	Gln	Leu	Glý	Gly	Ala	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	His	Ala	Pro
			20					25					30		
Trp	Asp	Asn	His	Val	Ser	Gly	His	Ala	Leu	Phe	Thr	Glu	Thr	Pro	His
		35					40					45			
Asp	Met	Thr	Ala	Arg	Thr	Gly	Glu	Asp	Val	Glu	Met	Ala	Cys	Ser	Phe
	50					55					60				•
Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Glu	Ile	Gln	Trp	Trp	Tyr
65					70					75					80
Val	Arg	Ser	His	Arg	Asp	Trp	Thr	Asp	Lys	Gln	Ala	Trp	Ala	Ser	Asn
				85					90					95	
Gln	Val	Val	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Asn	He	Ser	His	Lys	Leu	Arg	Leu
			100					105				•	110		
Ser	Arg	Val	Lys	Pro	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Val	He
		115					120					125			
Asp	Phe	Ser	Asp	Gly	Lys	Ala	Arg	His	His	Lys	Val	Lys	Ala	Tyr	Leu
	130					135					140				
Arg	Val	Gln	Pro	Gly	Glu	Asn	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Leu	Thr	Trp
145					150					155					160
Thr	Trp	Gly	Cys	Gly	Gln	End									
				165											

09	120	180	240	300	360	420	480	540	009	099	720	726
cleaggeece	gtctgtgcag	aatcaggaag	cttgctgcag	ccaggactca.	gggcttccag	tctggacaac	tgatgcccct	gctcttagcc	caccagecag	tgccacctgc	tggcggccgg	
atggccccag cetteetget getgetgetg etglggccae agggttgegt eleaggecee	tetgetgaca gigtatacae aaaagigagg eteetigaag gggagaetet gietgigeag	tttggtgcaa	aagaagtgtg agcctggctt tgcccgagtc tgggtgaaag ggccccgcta cttgctgcag	ccctcaagct	ggccgatact ggtgcatgcg caacacetet gggateetgt accettgat	ciggaigigt ciccagcice ccaaacigag aggaacatic citicacaca iciggacaac	atceteaaga giggaacigi cacaacigge caageeecia ecteaggeee igaigeeeci	tttaccactg gigigaiggi giicacccca ggacicaica cciigcciag gcictiagcc	tecgecagae etgeetecaa gacaggetae agetteaetg etaceageae caceagecag	ggacccagga ggaccatggg gtcccagaca gtgaccgcgt ctcccagcaa tgccacctgc	cegggegge getegagece tatagigagt aagggegaat tecageacae tggeggeegg	
ctgtggccac	ctccttgaag	gaggcaagg	tgggtgaaag	accatggtgg	gggateetgt	aggaacattc	caagccccta	ggactcatca	agcttcactg	gtgaccgcgt	aagggcgaat	
gctgctgctg	aaaagigagg	aaaccgcgtg	tgcccgagtc	ggtcaacatc	caacaccici	ccaaactgag	cacaactggc	gttcaccca	gacaggetac	gtcccagaca	tatagigagi	
ccttcctgct	gigiatacac	agggetaca	agcctggctt	aggccaaggt	ggtgcatgcg	ctccagctcc	gtggaactgt	gtgtgatggt	ctgcctccaa	ggaccatggg	gctcgagccc	
atggcccag	tctgctgaca	tgetectata agggetacaa aaacegegtg gagggeaagg titggtgeaa aateaggaag	aagaagtgtg	gacgatgece aggecaaggt ggteaacate accatggtgg ceeteaaget ceaggaetea	ggeegatact	ciggaigtgi	atcctcaaga	tttaccactg	tecgecagae	ggacccagga	າວສີສິ່ວສີສີສິ່ວວ	tactag

10/59

Met	Ala	Pro	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Pro	Gln	Gly	Cys
				5 .					. 10					15	
Val	Ser	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ser	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Arg	Leu	Leu
			20					25					30		
Glu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ser	Val	Gln	Cys	Ser	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Lys	Asn
		35					40					45			
Arg			Gly	Lys	Val	Trp	Cys	Lys	He	Arg	Lys	Lys	Lys	Cys	Glu
	50					55					60				
		Phe	Ala	Arg	Val	Trp	-Va I	Lys	Gly	Pro	Arg	Tyr	Leu	Leu	Gln
65					70					75					80
Asp	Asp	Ala	Gln		Lys	Val	Val	Asn		Thr	Met	Val	Ala		Lys
				85					90					95	
Leu	Gln	Asp	Ser	Gly	Arg	Tyr	Trp		Met	Arg	Asn	Thr		Gly	lle
_	_	_	100					105					110		
Leu	Tyr		Leu	Met	Gly	Phe		Leu	Asp	Val	Ser		Ala	Pro	Gln
m1	01	115		.,	_	D 1	120	•••				125	_	_	_
Int		Arg	Asn	116	Pro		Inr	HIS	ren	Asp		116	Leu	Lys	Ser
01	130	37 - 1	17°L -	ጥե	01	135	A 1	n	mt	.	140	.			_
	Inr	vai	Thr	1111			AIA	Pro	inr			Pro	ASP	AIA	
145	ጥե _	Th -	C1	₩ a 1	150		DL.	۳ ۱	n	155		T1 ~	ML	T	160
rne	IIII	1111	Gly	1.65	wer	Yaı	rne	1111	170	GIY	Leu	116	INT		PFO
Ara	I An	I au	Ala		Ala	A ** c*	Dro	A 1 a		T we	The	Clv	Т	175	Dha
uig	ren	Leu	180	מבז	nia	MI B	110	185	261	r à 2	1111	GIA	191 190	261	rue
Thr	Δla	Thr	Ser	Thr	Thr	202	Gln		Dro	Δτσ	Δrσ	The		Clv	Sar
1111		195	501	*111	1111		200	GIJ	110	111 6	лг	205	me t	Uly	561
Gin	•		Thr	Ala	Ser			Aen	Δla	Th r	Cve		Clv	CI v	Ara
0111	210	142	****			215	001	uoin	MI G	1111	220	110	u,	U1 y	ni e
Ser		Pro	lle	Val			Glv	G1n	Phe	Gln		Thr	Glv	Glv	Arp
225					230	ں ر ہے	-17	214		235			-11	•	240
Tyr	End									200					M T U
- 3 -															

240 120 180 300360 gecgaecigg ceaiggggee ecgaececae icegigiggg giteeieleg giggeigaga geticacage cacaggeeet getigicata gecagggge igeagacate gggcagagag catgetgget geagatteeg ettegggagg eaggaegaag geagtgagge eaceggette atggtaagge ettacecect gatetaette etetteetge egetgggege etgetteeet ctactggaca gaagagagcc cacagacgcc atgggiggcc tcggagctgg agaacgcigg ciccigcig eggggggga gaccagegge eegitaggga acciggetga ggageteaat ggctacagca ggaagaaagg cggcttcagc ttccgcttcg gtcggcggtg 12/59

Me t	Val	Arg	Pro	Tyr	Pro	Leu	He	Tyr	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Gly
				5		•			10					15	
Ala	Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Arg	Glu	Pro	Thr	Asp	Ala	Met	Gly
			20					25					30		
Gly	Leu	Gly	Ala	Gly	Glu	Arg	Trp	Ala	Asp	Leu	Ala	Met	Gly	Pro	Arg
		35					40		·			45	٠		
Pro	His	Ser	Val	Trp	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Arg	Ala	Ser	Gln	Pro
	50					55					60				
Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	Leu	Gln	Thr	Ser	Gly	Arg	Glu
65					70					75					80
His	Ala	Gly	Cys	Arg	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	Gln	Asp	Glu	Gly	Ser	Glu
				85				•	90					95	
Ala	Thr	Gly	Phe	Leu	Pro	Ala	Ala	Gly	Glu	Lys	Thr	Ser	Gly	Pro	Leu
			100					105					110	•	
Gly	Asn	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Asn	Gly	Tyr	Ser	Arg	Lys	Lys	Gly	Gly
		115					120					125			
Phe	Ser	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg	End							
	130					135				•					

360	cttcagcttc	ggaaggagg	oggoogeor 1	vissskatit isktakkka gcitagtagt iatagttggt ggaagggagg tittagtitt tgctitggtt ggiga	tggtagagga ggtga	ogetteggee ggtga
300	cagcggccc	cagagaaggc	ccacigact	gacagiggea gigaagecae ggggiiceig eccacigaei cagagaagge cageggeece	gigaagecae	ದ
240	agggaggcag	gcttccgtct	gagcacactg	giggecaagg ageageagge cicicgeagg gageacig getteegiet agggaggeag	agcagcaggc	ρĎ
180	cigacigagg gacacaccc cegeicagii caaagiceae ggceacagge ceigeiegig	ggccacaggc	caaagiccac	ccgctcagtt	gacacacccc	Ø
. 120	ciggacagaa ggggacceae agacaieggi gacaieggag ceagaaigag eigggieeag	ccagaatgag	gacateggag	agacaicggi	gggacceac	ਲ
09	algaggigee telgetettg gettigeete etectgeete tgagigeetg etiteetetg	tgagtgcctg	ctcctgcctc	gcitigccic	tetgetettg	ပ္

['] 14/59

Met	Arg	Cys	Leu	Cys	Ser	Trp	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala
				5					. 10					15	
Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Arg	Gly	Pro	Thr	Asp	He	Gly	Asp	Ile
			20					25					30		
Gly	Ala	Arg	Me t	Ser	Trp	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Gly	His	Thr	Pro	Arg
		35					40					45			
Ser	Val	Gln	Ser	Pro	Arg	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Lys	Glu
	50					55					60				
Gln	Gln	Ala	Ser	Arg	Arg	Glu	His	Thr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Arg	Gln
65					70					75					80
Asp	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Thr	Gly	Phe	Leu	Pro	Thr	Asp	Ser	Glu	Lys
				85					90					95	
Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ser
			100					105					110		
Arg	Arg		Gly	Gly	Phe	Ser	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg				
		115			•		120					125			

100 89 136 30 48 MVRPYPLIYFLFLPLGACPPLLDRRBPTDAMGGLGAGERWADLAMGPRPH MRCLCSWLC-LLLPLSACFPLLDRRGPTD-IGDIGARMSWVQLTEGHTPR SVWGSSRWLRASQPQALLVIARGLQTSGRBHAGCRPRFGRQDEGSBATGF SV-----QSPRPQALLVVAXBQQASRRBHTG--FRLGRQDSGSBATGF LPAAGEKITSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRFGRR LPADSEKASGPLGTLAEELSSYSRRKGGFSFRFGR human rat human rat human

図16

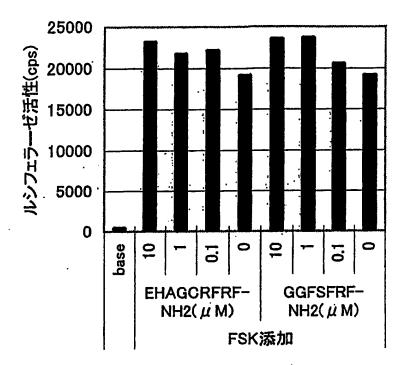


図 1 7

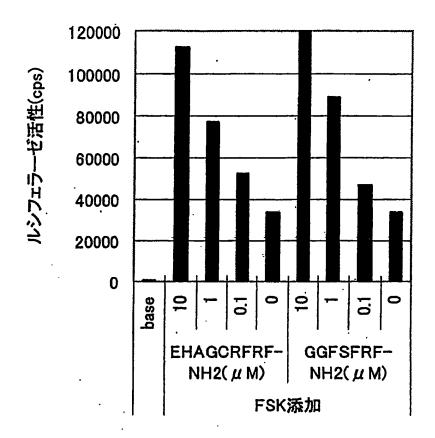


図18

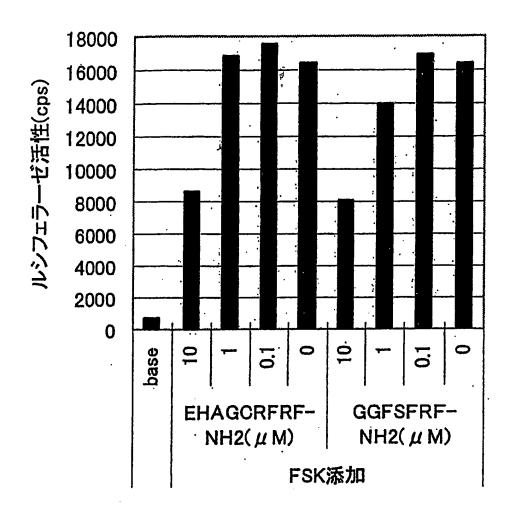


図 1.9

aggggct	tccggccttt	atgagggget teeggeettt gettteeeta etteteeete tgagtgeetg ettteeetg	cttctccctc	tgagtgcctg	ctttcccctg	9
acagaa	gggacccac	ciggacagaa ggggacccac agacatcggt gacatcggag ccaggatgaa cigggcccag	gacaicggag	ccaggatgaa	ctgggcccag	120
ctgagg	gacatecece	ciggoigagg gacaicece caacieggii caaaiceae agecaeagge ecigeiigig	caaaatccac	agecacagge	cetgettgtg	180
ccaggg	agcagcaggc	giggecaggg ageageagge eteceacagg gageaceeg getteegtet agggaggeaa	gagcacaccg	gcttccgtct	agggaggcaa	a · 240
gtagca	gtgaggccgc	gacggiagca gigaggccgc agggiiccig cccgccgaci cggagaaggc cagcggccci	ccgccgact	cggagaaggc	cageggeeet	300
ggactc	tggcagagga	ciggggacic iggcagagga gcigagcage iacageegga ggaagggagg etteageite	tacagcegga	ggaagggagg	cttcagcttc	360
cgctttggac .ggtga	ggtga					375

20/59

Met	Arg	Gly	Phe	Arg	Pro	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala
		-		5					10					15	
Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Arg	Gly	Pro	Thr	Asp	Ile	Gly	Asp	He
			20					25					30		
Gly	Ala	Arg	Met	Asn	Trp	Ala	Gln	Leu	Ala	Glu	Gly	His	Pro	Pro	Asn
		35					40					45			
Ser	Val	Gln	Asn	Pro	Gln	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Arg	Glu
	50					55					60				
Gln	Gln	Ala	Ser	His	Arg	Glu	His	Thr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Arg	Gln
65					70					75					80
Asp	Gly	Ser	Ser	Glu	Ala	Ala	Gly	Phe	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser	Glu	Lys
				85					90					95	
Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ser
			100					105					110		
Arg	Arg	Lys	Gly	Gly	Phe	Ser	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg				
		115					120					125			

図21

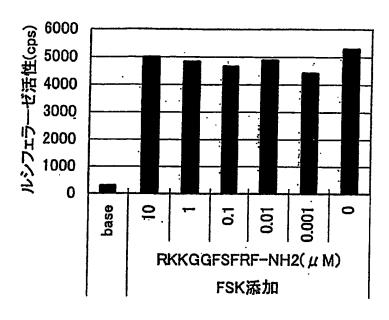
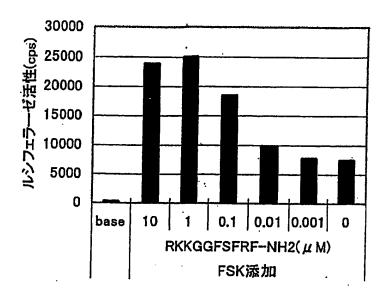
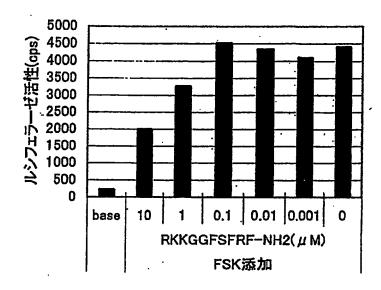


図22

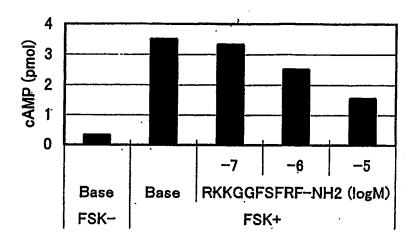


28/59

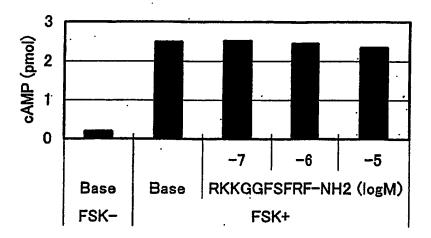


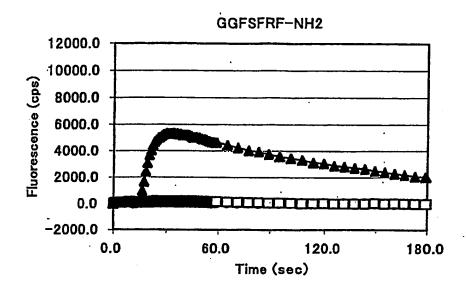
24/59

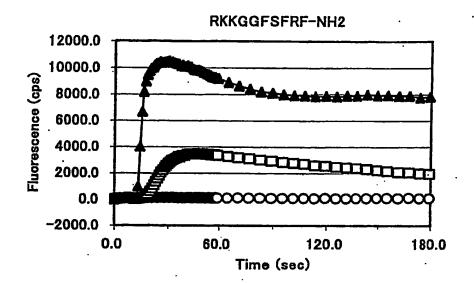
図24



25/59

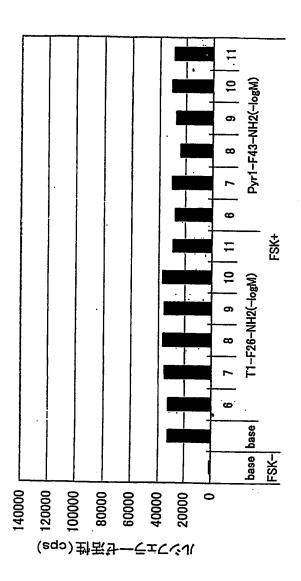






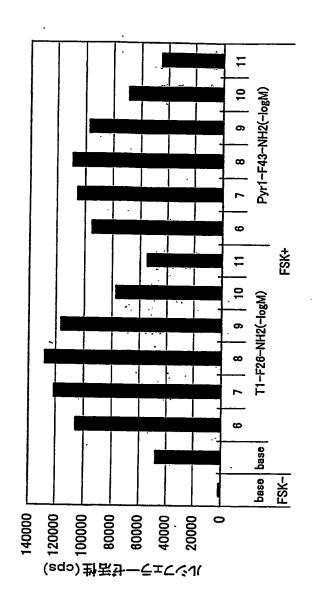
28/59

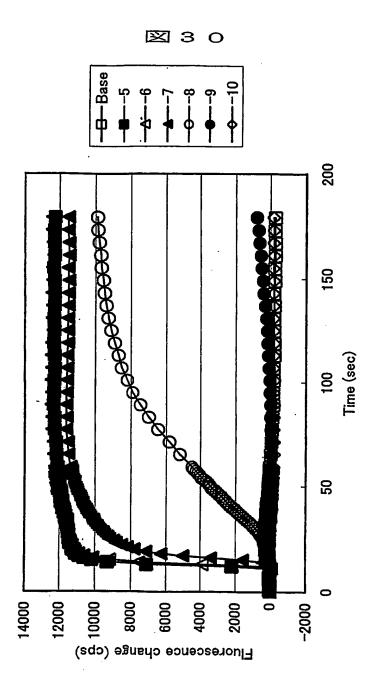
図28



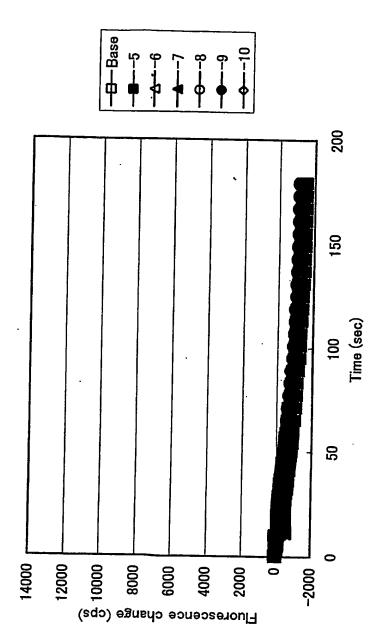
29/59

図29



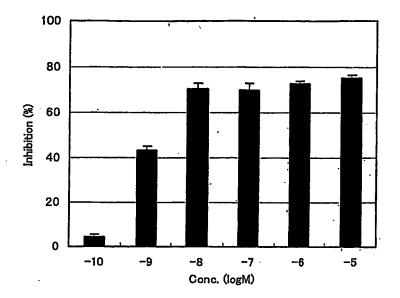






32/59

図32



33/59

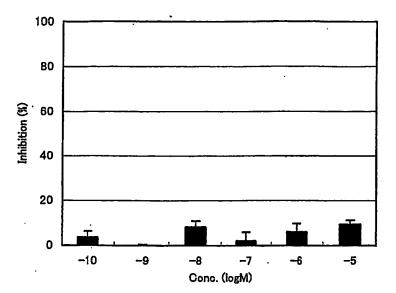


図34

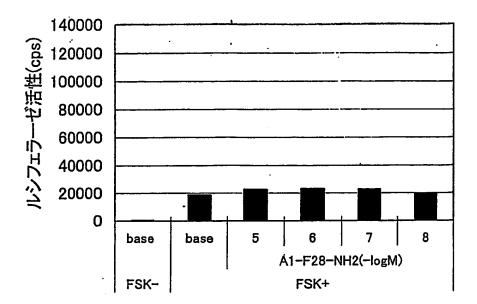
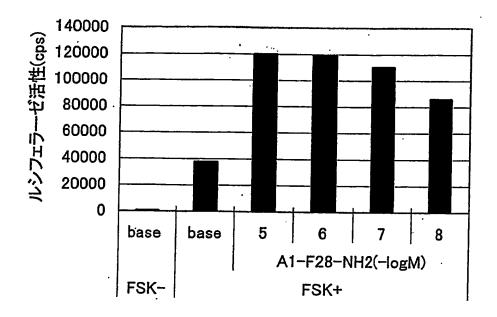
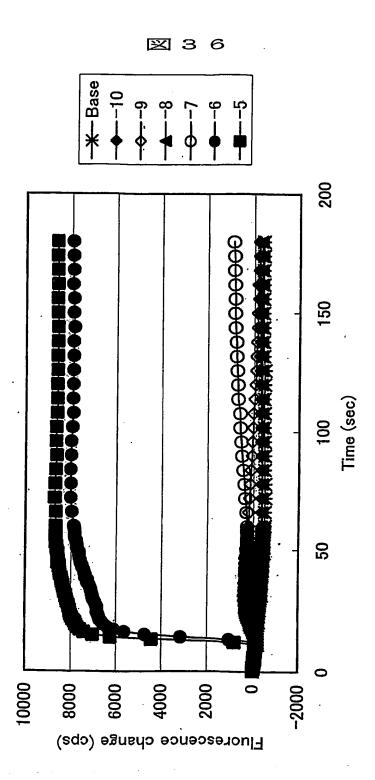


図35





37/59

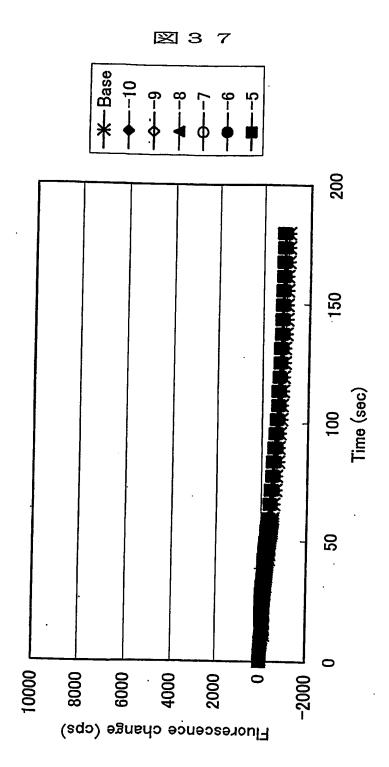
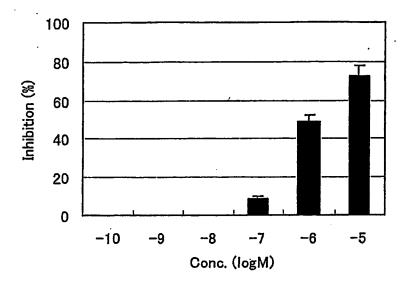


図38



39/59

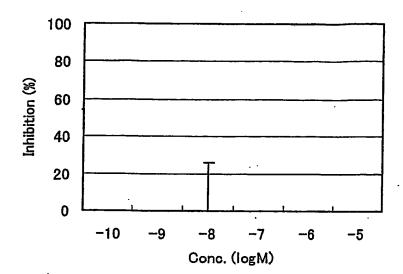


図 4 (

	. 180 240 300 360 405	gagagccccg ggcgcgtgct cctcctcctg caatggctac	ctgggtggcc cgtcaggcaa aggccactgg ctgaggagct	gcggg gcggg cagcg cctgg	teeee gaect gatee gaaco ttcee	atggaccegg cgagggacg ccctttccg tggggctcc ctgggtggcc gagagccccg taccacacg ccctgctcgt cacggccaag gagctgcggg cgtcaggcaa ggcgcgtgct ggcttccagc tgcgtctcgg gaggcaggac gatggcagcg aggccactgg cctcctcctg ggggaggccg agaaggtggg gggcctgttg ggaacctgg ctgaggagct caatggctac agcaggaaga aggggggctt cagcttccgc ttcggtcgc getga
	ب ب	ggcgcgtgc	cgtcaggcaa	agctgcggg	ති	cacggccaag g
180	•	gagagccccg	ctgggtggcc	gggctccc	تو	ccctttccg tg
120		aatgagctgg	ccggacgtga	agggggca	. C.	gtgctggaca cagaggagcc tgtggatgcc gtaggggggca ccggacgtga aatgagctgg
$\overline{}$	09 .	ctgcttcccg	ccctgggtgc	gttcctgc	ct	atgoggagoc ettactocot gocotacoto etgitocigo cootgggigo etgoitocog

41/59

Met	Arg	Ser	Pro	Tyr	Ser	Leu	Pro	Tyr	Leu	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	G1y
				5		•			10					15	
Ala	Cys	Phe	Pro	Val	Leu	Asp	Thr	Glu	Glu	Pro	Val	Asp	Ala	Val	Gly
			20				•	25					30		
G1y	Thr	Gly	Arg	Glu	Met	Ser	Trp	Met.	Asp	Pro	Ala	Arg	G1y	Arg	Pro
		35					40					45			
Phe	Pro	Trp	Gly	Ser	Pro	Gly	Trp	Pro	Arg	Ala	Pro	Tyr	Pro	His	Ala
	50					55					60				
Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu	Arg	Ala	Ser	G1y	Lys	Ala	Arg	Ala
65					70					75					90
					10					10					80
	Phe	Ġ1n	Leu	Arg		Gly	Arg	Gln	Asp		Gly	Ser	Glu	Ala	
	Phe	Ġ1n	Leu	Arg 85		Gly	Arg	Gln	Asp 90		Gly	Ser	Glu	Ala 95	
Gly	Phe Leu			85	Leu				90	Asp				95	Thr
Gly				85	Leu				90	Asp				95	Thr
Gly Gly		Leu	Leu 100	85 Gly	Leu Glu	Ala	Glu	Lys 105	90 Val	Asp Gly	Gly	Leu	Leu 110	95 Gly	Thr Thr
Gly Gly	Leu	Leu	Leu 100	85 Gly	Leu Glu	Ala	Glu	Lys 105	90 Val	Asp Gly	Gly	Leu	Leu 110	95 Gly	Thr Thr
Gly Gly Leu	Leu	Leu Glu 115	Leu 100 Glu	85 Gly Leu	Leu Glu Asn	Ala Gly	Glu Tyr	Lys 105	90 Val	Asp Gly	Gly	Leu Gly	Leu 110	95 Gly	Thr Thr

42/59

atgcaggcgc	tcaacatcac	cgcggagcag	ttctcccggc	tgctgagcgc	gcacaacctg	60
actcgggagc	agttcattca	tcgctatggg	ctgagaccgc	tggtctacac	tccggagctg	120
cccgcgcgtg	ctaaagtggc	ctttgcgctg	gcaggagcac	tcatttttgc	cctggcgctc	180
ttcggcaact	ctctggtcat	ctatgtggtg	acccgcagca	aggccatgcg	caccgtcacc	240
aacatcttca	tctgctctct	ggcactcagt	gatctgctca	ttgccttctt	ctgcatcccc	300
gtcacgatgc	tccagaacat	ctccgacaag	tggctgggtg	gtgccttcat	ctgcaagatg	360
gtaccctttg	tccagtccac	ggccgtcgtg	acagaaatcc	tcaccatgac	ctgcatcgct	420
gttgagaggc	accaaggact	tgtccatcct	tttaaaatga	agtggcagta	caccacccga	480
agggccttca	cgatcttggg	cgtggtctgg	ttggcggcca	tcatcgtagg	atcacccatg	540
tggcacgtgc	aacgccttga	gattaagtat	gacttcctct	atgaaaaaga	acacatctgc	600
tgcttggaag	aatgggccag	ccccgtgcac	cagagaatct	acagcacctt	cattctcgtc	660
atcctcttcc	tcctgcctct	tgtggtaatg	ctagtcctct	atagcaagat	tggctatgaa	720
ctgtggatca	agaagagagt	gggagacagt	tcagcgcttc	aaactatcca	cgggaaagaa	780
atgtccaaaa	tagccaggaa	gaagaagcgg	gctgtcatta	tgatggtgac	tgtggtggct	840
ctctttgctg	catgctgggc	acctttccac	gttgttcaca	tgatggttga	gtacagtaat	900
tttgaaaaaag	aatatgatga	tgtcacaatc	aagatggtct	ttgctgtcgc	gcagacaatt	960
ggctttttca	actccatctg	taatcccttt	gtgtatgcgt	ttatgaatga	aaacttcaaa	1020
aagaattttc	tgtctgctgt	ttgttattgc	atagtgaaag	aatcctcctc	cccagcacgg	1080
aagcctggga	attctggaat	atcaatgatg	cagaagagag	caaagttatc	tcgaccacag	1140
cgtccagtgg	aagaaaccaa	aggagacaca	ttcagtgatg	ccagcattga	tgtcaaattg	1200
tgcgagcagc	cgcgggagaa	aagacaactc	aagagacagc	tagccttctt	cagttctgaa	1260
ctttctgaaa	actctacttt	tggtagtggc	catgaactgt	aa		1302

43/59

図 4 3

Met 6in Ala Leu Asn ile Thr Ala 6iu 6in Phe Ser Arg Leu Leu Ser 5 10 Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg . 25 Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Val Ala Phe · 40 35 45 Ala Leu Ala Gly Ala Leu IIe Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser 55 Leu Val lie Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr 65 70 75 80 Asn lie Phe ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu ile Ala Phe 85 90 95 Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gin Asn ile Ser Asp Lys Trp Leu 100 · 105 110 Gly Gly Ala Phe lie Cys Lys Met Vai Pro Phe Vai Gin Ser Thr Aia 115 120 125 Val Val Thr Glu lie Leu Thr Net Thr Cys lie Ala Val Glu Arg His 135 140 Gin Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gin Tyr Thr Thr Arg 145 150 155 160 Arg Ala Phe Thr lie Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala lie lie Val 165 170 175 Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Arg Leu Glu IIe Lys Tyr Asp Phe 185 Leu Tyr Glu Lys Glu His 11e Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro 195 200 205 Val His Gin Arg 11e Tyr 'Ser Thr Phe 11e Leu Val 11e Leu Phe Leu 215 220 Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys 11e Gly Tyr Glu 225 230 235 240 Leu Trp lie Lys Lys Arg Val Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gin Thr lie 245 250 255 His Gly Lys Glu Met Ser Lys lie Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val 260 265 270 lle Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro 275 280 285 Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu 290 295 300 Tyr Asp Asp Val Thr lie Lys Met Vai Phe Aia Val Ala Gin Thr lie 305 310 315 320 Gly Phe Phe Asn Ser IIe Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn 325 330 Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Vai Cys Tyr Cys Ile Val 340 345 350 Lys Glu Ser Ser Ser Pro Ala Arg Lys Pro Gly Asn Ser Gly lie Ser 355 360 365 Met Met Gin Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Pro Gin Arg Pro Val Giu 375 Glu Thr Lys Giy Asp Thr Phe Ser Asp Ala Ser lie Asp Val Lys Leu 385 390 395 400 Cys Glu Gin Pro Arg Glu Lys Arg Gin Leu Lys Arg Gin Leu Ala Phe 405 . 410 Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu 425 Leu End

44/59

atgcaggcgc	tcaacatcac	cgcggagcag	ttttcccggc	tgctgagcgc	gcacaacctg	60
actcgggaac	agttcattca	tcgctatggg	ctgcgaccgc	tggtctacac	tccggagctg	120
cccgcgcgcg	ctaaactggc	ctttgcgctg	gctggagcac	tcatttttgc	cctggcgctc	180
tttggcaact	ctctggtcat	ctatgtggtg	acccgcagca	aggccatgcg	caccgtcacc	240
aacatcttca	tctgctctct	ggcactcagt	gatctgctca	ttgccttctt	ctgcatcccc	300
gtcacgatgc	tccagaacat	ctccgacaag	tggctgggtg	gtgccttcat	ctgcaagatg	360
gtgcccttcg	tccagtccac	tgctgttgtg	acggaaatcc	tcaccatgac	ttgcatcgct	420
gttgagaggc	accaaggact	catccatcct	tttaaaatga	agtggcagta	cactacccga	480
agggctttca	caatcttggg	tgtggtctgg	ttggcagcca	tcatcgtagg	atcacccatg	540
tggcacgtac	aacgcctcga	gattaagtat	gacttcctct	atgagaaaga	acatgtctgc	600
tgtttggaag	agtgggccag	ccccatgcac	cagagaatct	acaccacctt	catcctcgtc	660
atcctcttcc	tcctgccgct	tgtggtgatg	cttgtcctct	acagcaagat	tggctatgaa	720
ctgtggatca	agaagagagt	tggagacagt	tcagcacttc	agactatcca	cgggaaagaa	780
atgtccaaaa	tagccaggaa	gaagaagcgg	gctgtcgtta	tgatggtgac	agtggtggct	840
ctcttcgctg	cgtgctgggc	acctttccat	gttgttcaca	tgatggttga	gtacagtaac	900
tttgaaaaag	agtatgatga	tgtcacaatc	aagatggttt	ttgctgttgc	acaaacaatt	960
ggctttttca	actccatctg	taatcccttt	gtgtatgcat	ttatgaatga	aaacttcaaa	1020
aagaattttt	tgtctgcggt	ttgttattgc	atagtaagag	aaaccttctc	cccaggacag	1080
aagcctggaa	attctgggat	ttcaatgatg	caaaagagag	caaagttatc	acgatcacag	1140
cgtccagtgg	cggaagccaa	aggagactta	ttcagcgatg	ccaacgttga	tgtcaaattg	1200
tgtgagcagc	caggggagaa	aaggcaactc	aagcgacagc	ttgccttctt	tagttctgaa	1260
ctttctgaaa	actctacttt	cggcagtgga	catgaactgt	aatatcgatg	а	1311

図 4 5

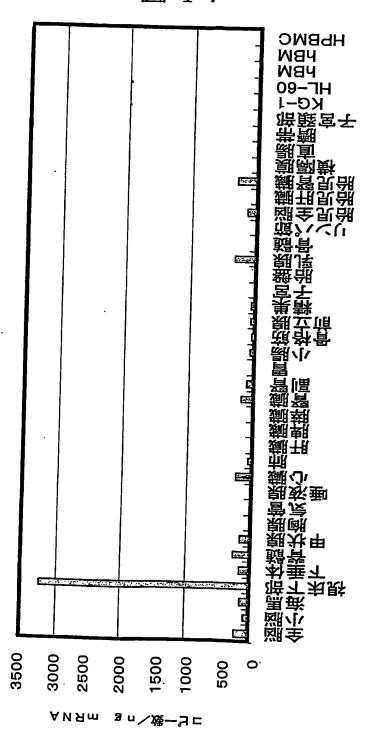
Met Gin Aia Leu Asn lie Thr Aia Giu Gin Phe Ser Arg Leu Leu Ser 10 Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gin Phe lie His Arg Tyr Gly Leu Arg 20 25 Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Leu Ala Phe · 40 45 Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser 55 Leu Val lie Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr 65 70 75 80 Asn ile Phe lle Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu lle Ala Phe 85 90 95 Phe Cys lie Pro Val Thr Met Leu Gin Asn lie Ser Asp Lys Trp Leu 105 110 Gly Gly Ala Phe lie Cys Lys Met Vai Pro Phe Vai Gin Ser Thr Ala 115 120 125 Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His. 135 140 Gin Gly Leu lie His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gin Tyr Thr Thr Arg 145 150 155 160 Arg Ala Phe Thr lie Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala lie lie Val 165 170 175 Gly Ser Pro Net Trp His Val Gln Arg Leu Glu lle Lys Tyr Asp Phe 180 185 190 Leu Tyr Glu Lys Glu His Val Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro 195 200 205 Wet His Gin Arg Ile Tyr Thr Thr Phe He Leu Val Ile Leu Phe Leu 215 220 Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys lie Gly Tyr Glu 225 230 235 240 Leu Trp lie Lys Lys Arg Vai Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gin Thr lie 245 250 His Gly Lys Glu Net Ser Lys IIe Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val 260 265 270 Val Met Wet Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro 275 280 285 Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu 290 295 300 Tyr Asp Asp Val Thr lie Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gin Thr lie 305 310 315 Gly Phe Phe Asn Ser lie Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn 325 330 Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys ile Val 340 345 350 Arg Glu Thr Phe Ser Pro Gly Gln Lys Pro Gly Asn Ser Gly 11e Ser 355 360 365 Met Met Gin Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Ser Gin Arg Pro Val Ala 370 375 380 Glu Ala Lys Gly Asp Leu Phe Ser Asp Ala Asn Val Asp Val Lys Leu 385 390 395 400 Cys Glu Gin Pro Gly Glu Lys Arg Gin Leu Lys Arg Gin Leu Ala Phe 405 · 410 415 Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu 420 425 Leu End Tyr Arg End

435

46/59

1	MOALNITIPEOFSRLLIRDHNLTREOFT ALMRIRPLVYTPELPIGRAKLALVILI	Α
1	MQALNI TIPEQFSRLLRDHNLTREQFTALMRLRPLVYTPELPGRAKLALVL MQALNI TAEQFSRLLSAHNLTREQFTHRYGLRPLVYTPELPARAKMAFAL	В
1	MQALNI TAEQFSRLLSAHNLTREQFI HRYGLRPLVYTPELPARAKLAFAL	С
	•	
51	TEVLI FALALFENAL VFYVVTRSKAMRTVTNI FI CSLALSDLLI TFFCI P	Α
51	AGALI FALALFGNSLVI YVVTRSKAMRTVTNI FI CSLALSDLLI AFFCI P	В
51	AGALI FALALFGNSLVI YVVTRSKAMRTVTNI FI CSLALSDLLI AFFCI P	С
•		_
101	VTMLQNI SDNMLGGAFI CKMVPFVQSTAVVTEI LTMTCI AVERHQGLVHP	Α
101	VTMLQNI SDKWLGGAFI CKMVPFVQSTAVVTEI LTMTCI AVERHQGLVHP	В
101	VTMLQNI SDKWLGGAFI CKMVPFVQSTAVVTEI LTMTCI AVERHQGLTHP	C
		_
151	FKMKWQYTNRRAFTMLGVVWLVAVI VGSPMWHVQQLEI KYDFLYEKEHI Q	Α
151	FKMKWQYTTRRAFTI LGVVWLAATI VGSPMWHVQRLEI KYDFLYEKEHI C	В
151	FKMKWQYTTRRAFTI LGVVWLAAI I VGSPMWHVQRLEI KYDFLYEKEHVO	C
		-
201	CLEEWTSPVHQK YTTFI LVI LFLLPLMVML LYSKI GYELW KKRVGDG	Α
201	CLEEWASPYHORI YSTFI LVI LFLLPLVVMLVLYSKI GYELWI KKRVGDS	В
201	CLEEWASPMHQRI YTTFI LVI LFLLPLVVMLVLYSKI GYELWI KKRVGDS	C
251	SVERTI HIKEMSKI ARKKKRAVI MMVTVVAL FAVOVAPFHVVHMMI EYSN	A
251	BALQTI HGKEMSKI ARKKKRAVI MMVTVVALFAACWAPFHVVHMMVEYSN	В
251	SALQTI HGKEMSKI ARKKKRAVVMMVTVVALFAACWAPFHVVHMMVEYSN	С
301	FEKEYDDVTI KMI FAI VQI I GFISNSI CNPI VYAFMNENFKKNVLSAVCYQ	Α
301	FEKEYDDVTI KMVFAVAQTI GFFNSI CNPFVYAFMNENFKKNFLSAVCYO	В
301	FEKEYDDVTI KMVFAVAQTI GFFNSI CNPFVYAFMNENFKKNFLSAVCYO	С
351	WINKITSPAORHONSOITMMRIKKARFSILRENPVEETKOEAFSDONI EVKL	Α
351	VNK[FSPAQRHGNSG]]TMMRKKAKFSLRENPVEETKGEAFSDGNI)EVKL VK[SSSPARKPGNSG SMMQKRAKLSRPQRPVEETKGDTFSDAS]DVKL	В
351	I VRETFSFGGKPGNSGI SMMQKRAKLSKSQRPVAHAKGDLFSDANVDVKL	С
401	CEQTEENKK KRHLALFIRSELAENSPLDSGH	Α
401	CEOPREKROLKROLAFFSSELSENSTFGSGHELL.	В
401	CEQPGEKRQLKRQLAFFSSELSENSTFGSGHEL.	С

図47



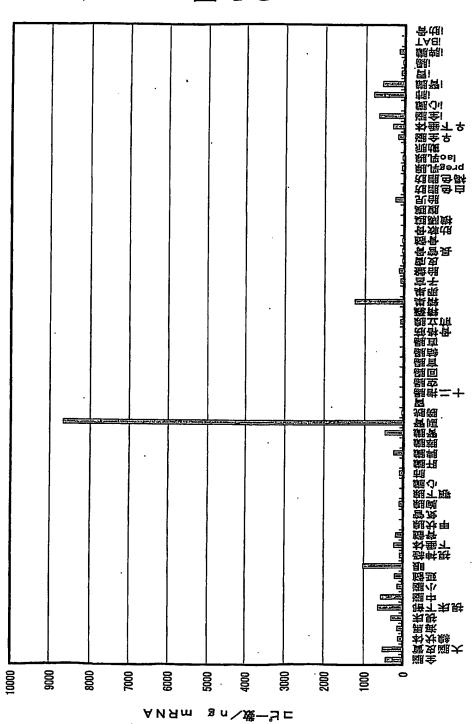


図49

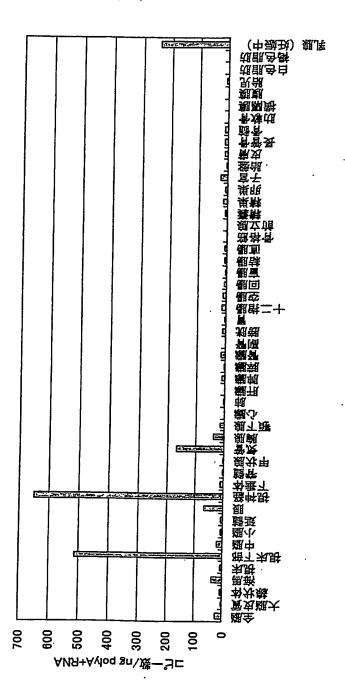


図 5 O

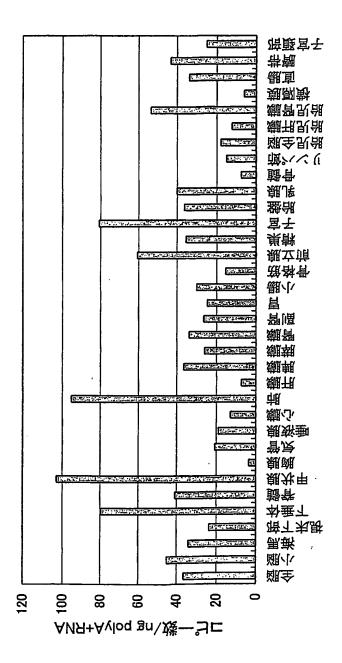


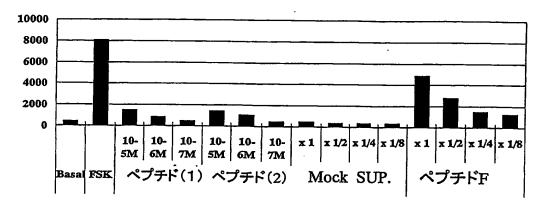
図 5 1

AQ27 分泌蛋白質
CXA 皮質属排移行帶' VP 投資原 BSTMA 分界条床核、内侧、前部 分界条床核、内侧、後部 + 分界条床核、外側、後部 + VLPO 投票前野校 ADP 投票前野核 VLPO 投票前野核 ADP 投票前野核 VMPOM 中央部 AHA 投票下部前野板 AHC 投票下部前野野、後野村 AHC 投票下部的性表验的 AHC 投票下部按核 MCPO 大細胞域 PaAP 投票下部按核 PVA 投票 PVA 投票 PVA 投票 PVMHC 投票
VP 淡蒼球 ++ BSTMA 分界条床核、内側、前部 + 分界条床核、外側、後部 + 分界条床核、外側、後部 + VP 視索前野核 + VLPO 投票前野核 + ADP 使用侧視索前野核 + VMPO 内侧视索前野核 + MPOM 人科区 中央部 AHA AHC 提床下部前野、後部 AHC 提床下部的扩展 + AHC 提床下部的扩展 + AHC 提床下部核、背帽域 + PaAP 提床下部核、设施部 + PAAP 提床下部核、设施部 + PVA 提床室傍核、设施部 + PVA 提供床室的核、企業 + PVMHC 提供床室的核、中心部 +
BSTMA 分界条床核、内侧、前部
BSTLP
BSTLV 分界条床核、外側、腹部
LPO
VLPO 腹外侧視索前野核 + ADP 前背侧視索前野核 + VMPO 腹内侧视索前野核 + MPOM 内侧视索前野核 + AHA 視床下部前野、中心部 + AHP 視床下部前野、後部 + MCPO 大細胞性視索前野核 + PaAP 視床下部室傍核、背帽域 + PaDC 視床室傍核、前部 + PVA 視床室傍核、後部 + VMHC 視床下部腹内侧核、中心部 +
ADP 前背倒視索前野核 +
VMPO 腹内侧視索前野核 + MPOM 内侧視索前野核部、中央部 + AHA 視床下部前野、前部 + AHC 視床下部前野、中心部 + AHP 視床下部前野、後部 + MCPO 大細胞性視索前野核 + PaAP 視床下部室傍核、小細胞域 + PaBC 視床下部室傍核、背帽域 + PVA 視床室傍核、後部 + VMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
MPOM 内側視索前野核部、中央部 + AHA 視床下部前野、前部 + AHC 視床下部前野、中心部 + AHP 視床下部前野、後部 + MCPO 大細胞性視索前野核 + PaAP 視床下部室傍核、小細胞域 + PaDC 視床下部室傍核、背帽域 ++ PVA 視床室傍核、後部 + VMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
AHA 視床下部前野、前部 + AHC 視床下部前野、中心部 + AHP 視床下部前野、後部 + MCPO 大細胞性視索前野核 ++ PaAP 視床下部室傍核、小細胞域 + PaDC 視床下部室傍核、背帽域 ++ PVA 視床室傍核、後部 + VMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
AHC 視床下部前野、中心部 + AHP 視床下部前野、後部 + MCPO 大細胞性視索前野核 ++ PaAP 視床下部室傍核、小細胞域 + PaBC 視床下部室傍核、背帽域 ++ PVA 視床室傍核、前 + PVP 視床下部腹内側核、中心部 +
AHP
MCPO
PaAP 視床下部室傍核、小細胞域 + PaDC 視床下部室傍核、背帽域 ++ PVA 視床室傍核、前部 + PVP 視床室傍核、後部 + VMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
PaDC 視床下部室傍核、背帽域 ++ PVA 視床室傍核、前部 + PVP 視床室傍核、後部 + VMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
PVA 視床室傍核、前部 + PVP 視床室傍核、後部 + WMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
PVP 視床室傍核、後部 + H
VMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
VMHC 視床下部腹内側核、中心部 +
VMHDM視皮下部腹内側核 些内刷部 _
* · · · · · · VENT HPEX F) DO (X \ F) F) DO (X \ F)
VMHVL 視床下部腹内側核、腹外側部
[ZI 不確帯 ++
RCh 視交叉後野
ArcD 弓状核、背側部 + ++
ArcM 弓状核、内側部 +
ArcL
ArcMP 弓状核、内側後部
PH 視床下部後核 ++
LH 外側視床下部域
MPT 視蓋前域内側核
IGL 膝状体間小葉 +++
M1 一次運動皮質 +
M2 二次運動皮質 +
Cg1 帯状皮質、領域1 +
Cg2 帯状皮質、領域2 +
MeAD 扁桃体内側核、前背側部 +
MZMG 内侧膝状周辺带 ++
DMPAG中脳中心灰白質背内側部 ++
LPAG 中脳中心灰白質外側部 +
VLPAG 中脳中心灰白質腹外側部 +
BIC 下丘腕核
DRD 背側縫線核、背側域 +++
DRV 背側縫線核、腹側域 +++
PPtg 脚橋被蓋核 +
DRC 背側縫線核、尾側域 +++
I DT Indicated a 1 to 1
PPy 维体傍核 +
LD19 被金外貨機核
GGA 中心灰白質、α域 +++
CGB 中心灰白質、β域 +++
Sol 如東核 +

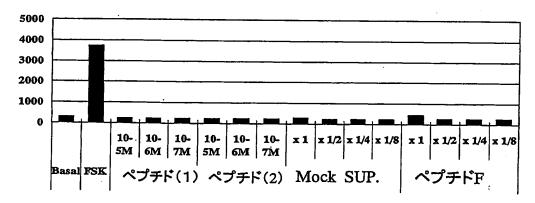
52/59

図 5 2

AQ27/HEK



pAKKO/HEK



53/59

図 5 3

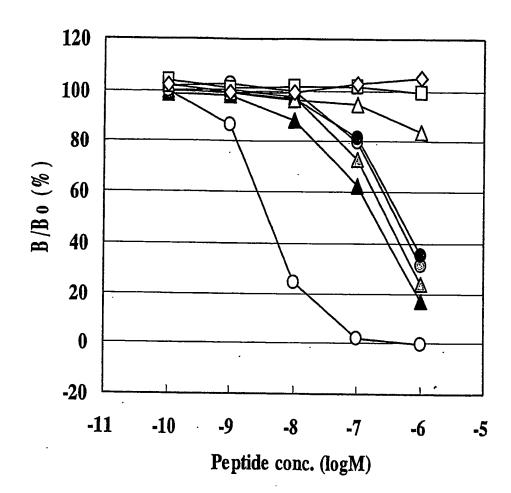
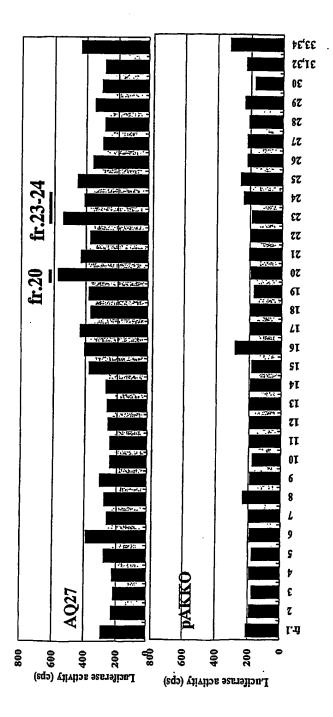


図 5 4



55/59

図 5 5

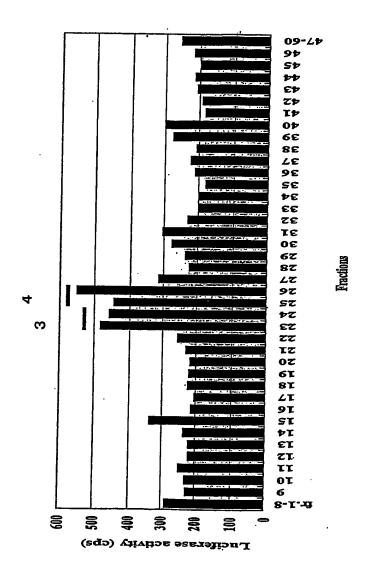


図 5 6

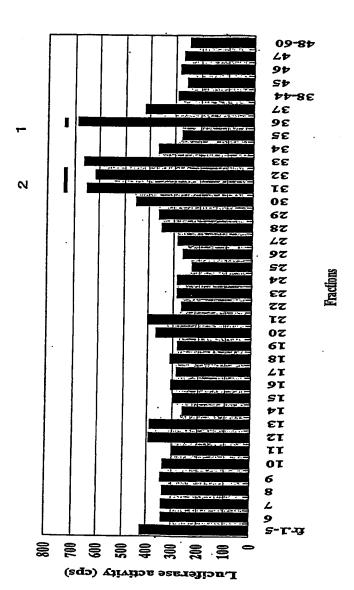


図 5 7

アミノ酸配列

測定值/理驗值

1: 4505.7/ 4505.0 Pyr-DEGSEATGFLPAAGEKTSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH₂(43アミノ酸)

EGSEATGFLPANGEKTSGREGNENERELNGYSRKKGGESFRF-NHZ (41752/20) 4678-3/4678-2 Rodegseatgrepaagektisgregonvareenggsrkggrsffffinh 4277.9/ 4278.8

AGEKTSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH2 (30アミノ酸)

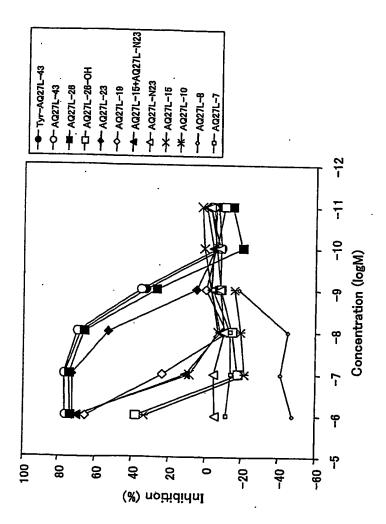
3: 3217.3/3218.6

2731.9/.2732.1

図 5 8

Name	Sequence	ECso (nM)
Tyr-AQ27L-43	YQDBGSEATGFLPAAGEKTSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRFNH2	3.2
AQ27L-43	PQDEGSEATGFLPAAGEKTSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRFNH2	2.7
AQ27L-26	TSGPLGNLABELNGYSRKKGGFSFRFnH2	3.9
AQ27L-26-OH	TSGPLGNLABELNGYSRKKGGFSFRF OH	>1000
. AQ27L-23	PLGNLAEELNGYSRKK GGFSFRFNH2	8.9
AQ27L-19	LAEELNGYSRKKGGFSFRFNH2	440
AQ27L-15	LNGYSRKKGGFSFRFNH2	480
AQ27L-N23	PQDEGSEATGFLPAAGEKTSGPLGNLAEE	Not detected
AQ27L-15+AQ27L-N23	PQDEGSEATGFLPAAGEKTSGPLGNLAEE+ LNGYSRKKGGFSFRFNH2	460
AQ27L-10	RKKGGFSFRFNHz	>1000
AQ27L-8	KGGFSFRFNH2	>1000
AQ27L-7	GGFSFRFNH2	>1000

図 5 9



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Secretory Protein And Its DNA

<130> 2958WOOP

<150> JP 2001-265829

<151> 2001-09-03

<150> JP 2001-294586

<151> 2001-09-26

<150> JP 2001-388011

<151> 2001-12-20

<150> JP 2001-401948

<151> 2001-12-28

<150> JP 2002-15976

<151> 2002-01-24

<150> JP 2002-88383

<151≥ 2002-03-27

<160> 65

<210> 1

<211> 83

<212> PRT

<213> Human

⟨400⟩ 1

Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp Asn

5

10

15

Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro Pro

20

25

30

Pro Cys Pro Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Asp Glu Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp Pro

2/39 50 55 60 Glu Pro Gly Pro Gly Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His Leu 65 70 75 80 Ala Ala Arg 83 <210> 2 <211> 100 <212> PRT <213> Human <400> 2 Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu 5 10 15 Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp 20 25 Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro 45 Pro Pro Cys Pro Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg 50 55 Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp 65 70 75 Pro Glu Pro Gly Pro Gly Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His 85 90 95 Leu Ala Ala Arg 100 ⟨210⟩ 3 <211> 112

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

PCT/JP02/08872

3/39

Met	Trp	Pro	Arg	Lys	Leu	Ala	Trp	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala
				5					10					15	
Pro	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Met	Ser	Arg	Met	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Glu
			20					25					30		
Gln	Ala	Phe	Ser	Trp	Gly	Arg	Ser	Arg	Gly	Val	Leu	Val	Gly	Ser	Leu
		35					40					45			
G1y	Leu	Asp	Pro	Arg	Glu	Trp	Gly	Arg	Asn	Arg	Ala	Leu	Arg	Asp	Arg
	50					55					60				
Asp	Tyr	Gly	Asp	Ala	Gly	Val	Gly	Gly	Thr	G1u	Arg	Gly	Val	Glu	Pro
65					70					75					80
Gly	Ala	G1y	Leu	Trp	Gln	Gly	His	Ser	Leu	Gly	His	Gly	Gln	Arg	G1n
				85					90					95	
Ala	Lys	Lys	Val	Gln	Gly	G1n	Met	Pro	Ser	His	Arg	Phe	Gln	Phe	Ser
			100					105					110		
<210)> 4														
<21	1> 2:	34													
<21	2> PI	RT													
<21	3> H1	uman													
<40	0> 4					•									
Met	Arg	Ala	Pro	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	His	Ala	Val	Asp
				5					10					15	
Met	Leu	Ala	Leu	Asn	Arg	Arg	Lys	Lys	Gln	Val	Gly	Thr	Gly	Leu	G1y
			20					25				•	30		
Gly	Asn	Cys	Thr	Gly	Cys	Ile	Ile	Cys	Ser	Glu	Glu	Asn	Gly	Cys	Ser
		35					40					45			
Thr	Cys	Gln	Gln	Arg	Leu	Phe	Leu	Phe	Ile	Arg	Arg	Glu	Gly	Ile	Arg
	50					55					60				
Gln	Tyr	Gly	Lys	Cys	Leu	His	Asp	Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Phe	Gly	Ile
65					70					75		•			80

4/39

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu Glu Ala Ala Thr Cys Gln Val Leu Ser Glu Ser Arg Lys Cys Pro Ile Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp Val Arg Pro Arg Gln Pro Gly Leu Gln Pro <210> 5 <211> 166 <212> PRT <213> Human <400> 5 Met Gly Ala Pro Leu Ala Val Ala Leu Gly Ala Leu His Tyr Leu Ala Leu Phe Leu Gln Leu Gly Gly Ala Thr Arg Pro Ala Gly His Ala Pro

Trp	Asp	Asn	His	Val	Ser	Gly	His	Ala	Leu	Phe	Thr	Glu	Thr	Pro	His
		35					40					45			
Asp	Met	Thr	Ala	Arg	Thr	Gly	Glu	Asp	Val	Glu	Met	Ala	Cys	Ser	Phe
	50					55					60				
Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Glu	Ile	Gln	Trp	Trp	Tyr
65		•			70					75					80
Val	Arg	Ser	His	Arg	Asp	Trp	Thr	Asp	Lys	Gln	Ala	Trp	Ala	Ser	Asn
		•		85					90					95	
Gln	Val	Val	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Ser	His	Lys	Leu	Arg	Leu
			100					105					110		
Ser	Arg	Val	Lys	Pro	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Va1	Ile
		115					120					125			
Asp	Phe	Ser	Asp	Gly	Lys	Ala	Arg	His	His	Lys	Val	Lys	Ala	Tyr	Leu
	130					135					140				
Arg	Val	G1n	Pro	Gly	Glu	Asn	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Leu	Thr	Trp
145					150					155					160
Thr	Trp	Gly	Cys	Gly	Gln										
				165											
<210	0> 6														
<21	1> 24	41													
<21	2> PI	RT													
<21	3> Hu	uman													
<400	0> 6														
Met	Ala	Pro	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Pro	Gln	Gly	Cys
				5					10					15	
Val	Ser	Gly	Pro	Ser	Ala	Asp	Ser	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Arg	Leu	Leu
			20					25					30		
Glu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ser	Val	Gln	Cys	Ser	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Lys	Asn
		35					40					45			

Arg Val Glu Gly Lys Val Trp Cys Lys Ile Arg Lys Lys Cys Glu

50 55 60

Pro Gly Phe Ala Arg Val Trp Val Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Leu Gln

65 70 75 80

Asp Asp Ala Gln Ala Lys Val Val Asn Ile Thr Met Val Ala Leu Lys

85 90 95

Leu Gln Asp Ser Gly Arg Tyr Trp Cys Met Arg Asn Thr Ser Gly Ile

100 105 110

Leu Tyr Pro Leu Met Gly Phe Gln Leu Asp Val Ser Pro Ala Pro Gln
115 120 125

Thr Glu Arg Asn Ile Pro Phe Thr His Leu Asp Asn Ile Leu Lys Ser 130 135 140

Gly Thr Val Thr Thr Gly Gln Ala Pro Thr Ser Gly Pro Asp Ala Pro 145 150 155 160

Phe Thr Thr Gly Val Met Val Phe Thr Pro Gly Leu Ile Thr Leu Pro 165 170 175

Arg Leu Leu Ala Ser Ala Arg Pro Ala Ser Lys Thr Gly Tyr Ser Phe 180 185 190

Thr Ala Thr Ser Thr Thr Ser Gln Gly Pro Arg Arg Thr Met Gly Ser 195 200 205

Gln Thr Val Thr Ala Ser Pro Ser Asn Ala Thr Cys Pro Gly Gly Arg 210 215 220

Ser Ser Pro Ile Val Ser Lys Gly Glu Phe Gln His Thr Gly Gly Arg
225 230 235 240

Tyr

<210> 7

<211> 249

<212> DNA

<213> Human

<400> 7 ccaccgccgg aagcctccca gtactgcggc cgccttgaat actggaaccc agacaacaag 60 tgctgcagca gctgcctgca acgcttcggg ccgccccct gcccggaact gtccagtctg 120 gcgtcacaac ccctgtctcg cctcctggat gagctggagg tgctggaaga gctgattgta 180 ctgctggacc ctgagcctgg gccaggtggg ggtatggccc atggcactac tcgacacctg 240 249 gccgcaaga <210> 8 <211> 300 <212> DNA <213> Human <400> 8 atggggcctg gacgatgcct cctgacggcc ttgttgcttc tggccctggc gccaccgccg 60 gaagceteee agtactgegg cegeettgaa tactggaace cagacaacaa gtgetgeage 120 agctgcctgc aacgcttcgg gccgccccc tgcccggaac tgtccagtct ggcgtcacaa 180 cccctgtctc gcctcctgga tgagctggag gtgctggaag agctgattgt actgctggac 240 cetgageetg ggeeaggtgg gggtatggee catggeacta etegacacet ggeegeaaga 300 <210> 9 <211> 336 <212> DNA <213> Human <400> 9 atgtggcccc gaaaactcgc ctggattttg gcggcggccg cgttggcgcc gggatcgtcc 60 aggggatgt ctagaatgte gtcgtccggc ttggagcagg cgttctcctg ggggcgaagc 120 aggggggttc ttgtggggtc actgggtctt gatccgcggg agtggggtag gaatagagcc 180 ctgagggaca gggactatgg cgacgcgggg gtgggaggta cagagagggg tgtcgagcct 240 ggagcagggc tatggcaggg acactcactg gggcatgggc agcgacaggc gaagaaggtt 300 cagggccaga tgcccagtca tcgatttcaa ttcagt 336 <210> 10 <211> 702

<212> DNA <213> Human

<400> 10

atgcgggcgc cactctgctt gctcctgctc gtcgcccacg ccgtggacat gctcgccctg 60 aaccgaagga agaagcaagt gggcactggc ctggggggca actgcacagg ctgtatcatc tgctcagagg agaacggctg ttccacctgc cagcagaggc tcttcctgtt catccgccgg 180 gaaggcatcc gccagtacgg caagtgcctg cacgactgtc cccctgggta cttcggcatc 240 cgcggccagg aggtcaacag gtgcaaaaaa tgtggggcca cttgtgagag ctgcttcagc 300 caggacttct gcatccggtg caagaggcag ttttacttgt acaaggggaa gtgtctgccc 360 acctgcccgc cgggcacttt ggcccaccag aacacacggg agtgccaggg ggagtgtgaa 420 tggggcctgg agagccgggt acgagaggct ggccgggctg ggcatgagga ggcagccacc 540 tgccaggtgc tttctgagtc aaggaaatgt cccatccaga ggccctgccc aggagagagg 600 agecceggee agaagaaggg caggaaggae eggegeeeae geaaggaeag gaagetggae 660 cgcaggctgg acgtgaggcc gcgccagccc ggcctgcagc cc 702

<210> 11

<211> 498

<212> DNA

<213> Human

<400> 11

atgggggcc cgctcgcgt agcgctggc gccctcact acctggcact tttcctgcaa 60 ctcggcggcg ccacgggcc cgccggcac gcgccctggg acaaccacgt ctccggccac 120 gccctgttca cagagacacc ccatgacatg acagcacga cgggcgagga cgtggagatg 180 gcctgctcct tccgcgcag cggctccccc tcctactcgc tggagatcca gtggtggtat 240 gtacggagc accgggactg gaccgacaag caggcgtgg cctcgaacca ggtggtcaag 300 gtggtggga gcaacatctc ccacaagctg cgcctgtcc gggtgaagcc cacggacgaa 360 ggcacctacg agtgccggt catcgacttc agcgacgga aggcccggca ccacaaggtc 420 aaggcctacc tgcggggg gtggacag gcaaggga gcaagggaagaacctcctc tcctaccatc cctcacttgg 480 acctgggggt gtggacag

<210> 12 <211> 723 <212> DNA <213> Human <400> 12 atggccccag ccttcctgct gctgctgctg ctgtggccac agggttgcgt ctcaggcccc 60 tetgetgaca gtgtatacac aaaagtgagg eteettgaag gggagaetet gtetgtgeag 120 tgctcctata agggctacaa aaaccgcgtg gagggcaagg tttggtgcaa aatcaggaag 180 aagaagtgtg agcctggctt tgcccgagtc tgggtgaaag ggccccgcta cttgctgcag 240 gacgatgccc aggccaaggt ggtcaacatc accatggtgg ccctcaagct ccaggactca 300 ggccgatact ggtgcatgcg caacacctct gggatcctgt accccttgat gggcttccag ctggatgtgt ctccagctcc ccaaactgag aggaacattc ctttcacaca tctggacaac 420 atcctcaaga gtggaactgt cacaactggc caagccccta cctcaggccc tgatgcccct tttaccactg gtgtgatggt gttcacccca ggactcatca ccttgcctag gctcttagcc 540 teegeeagae etgeeteeaa gaeaggetae agetteaetg etaceageac caccageeag 600 ggacccagga ggaccatggg gtcccagaca gtgaccgcgt ctcccagcaa tgccacctgc 660 ccgggcggcc gctcgagccc tatagtgagt aagggcgaat tccagcacac tggcggccgg 720 tac 723 <210> 13 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer <400> 13

34

gtcgaccatg gggcctggac gatgcctcct gacg

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

gtcgaccatg cgggcgccac tctgcctgct cctg

<220>

<223> Primer

<400> 17

PCT/JP02/08872

34

WO 03/020932

<210>	18	
<211>	33	
<212>	DNA :	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	18	
gctago	ctcag ggctgcaggc cgggctggcg cgg	33
<210>	19	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	19	
gtcga	ccatg ggggccccgc tcgccgtagc gctg	34
<210>	20	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	20	
gctag	ctcac tgtccacacc cccaggtcca agt	33
<210>	21	
<211>		
<212>	DNA	
	Artificial Sequence	
<220>		

<223> Primer <400> 21 34 gtcgaccatg gccccagcct tcctgctgct gctg <210> 22 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer <400> 22 33 gctagcctag taccggccgc cagtgtgctg gaa <210> 23 <211> 136 <212> PRT <213> Human <400> 23 Met Val Arg Pro Tyr Pro Leu Ile Tyr Phe Leu Phe Leu Pro Leu Gly 10 15 Ala Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Glu Pro Thr Asp Ala Met Gly 20 25 30 Gly Leu Gly Ala Gly Glu Arg Trp Ala Asp Leu Ala Met Gly Pro Arg 35 45 40 Pro His Ser Val Trp Gly Ser Ser Arg Trp Leu Arg Ala Ser Gln Pro 60 50 55 Gln Ala Leu Leu Val Ile Ala Arg Gly Leu Gln Thr Ser Gly Arg Glu

70

85

His Ala Gly Cys Arg Phe Arg Phe Gly Arg Gln Asp Glu Gly Ser Glu

Ala Thr Gly Phe Leu Pro Ala Ala Gly Glu Lys Thr Ser Gly Pro Leu

65

75

90

80

<213> Artificial Sequence

105 100 110 Gly Asn Leu Ala Glu Glu Leu Asn Gly Tyr Ser Arg Lys Cly Gly 115 120 125 Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg Arg 130 135 ⟨210⟩ 24 <211> 408 <212> DNA <213> Human <400> 24 60 atggtaaggc cttacccct gatctacttc ctcttcctgc cgctgggcgc ctgcttccct ctactggaca gaagagagcc cacagacgcc atgggtggcc tcggagctgg agaacgctgg 120 gccgacctgg ccatggggcc ccgaccccac tccgtgtggg gttcctctcg gtggctgaga 180 gcttcacagc cacaggccct gcttgtcata gccagggggc tgcagacatc gggcagagag 240 catgctggct gcagattccg cttcgggagg caggacgaag gcagtgaggc caccggcttc 300 ctccctgctg cggggggagaa gaccagcggc ccgttaggga acctggctga ggagctcaat 360 408 ggctacagca ggaagaaagg cggcttcagc ttccgcttcg gtcggcgg <210> 25 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer <400> 25 27 atggtaaggc cttacccct gatctac <210> 26 <211> 27 <212> DNA

14/39 <220> <223> Primer <400> 26 27 caaatccttc caaggcgtcc tggccct <210> 27 <211> 124 <212> PRT <213> Rat <400> 27 Met Arg Cys Leu Cys Ser Trp Leu Cys Leu Leu Pro Leu Ser Ala 5 10 15 Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Gly Pro Thr Asp Ile Gly Asp Ile 20 25 30 Gly Ala Arg Met Ser Trp Val Gln Leu Thr Glu Gly His Thr Pro Arg 35 40 45 Ser Val Gln Ser Pro Arg Pro Gln Ala Leu Leu Val Val Ala Lys Glu 55 60 Gln Gln Ala Ser Arg Arg Glu His Thr Gly Phe Arg Leu Gly Arg Gln 65 70 75 Asp Ser Gly Ser Glu Ala Thr Gly Phe Leu Pro Thr Asp Ser Glu Lys 85 90 95 Ala Ser Gly Pro Leu Gly Thr Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser 100 105 110 Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg 120

115

<210> 28

<211> 372

<212> DNA

<213> Rat

<400> 28						
atgaggtgcc to	ctgctcttg	gctttgcctc	ctcctgcctc	tgagtgcctg	ctttcctctg	60
ctggacagaa gg	gggacccac	agacatcggt	gacatcggag	ccagaatgag	ctgggtccag	120
ctgactgagg ga	acacacccc	ccgctcagtt	caaagtccac	ggccacaggc	cctgctcgtg	180
gtggccaagg ag	gcagcaggc	ctctcgcagg	gagcacactg	gcttccgtct	agggaggcag	240
gacagtggca gt	tgaagccac	ggggttcctg	cccactgact	cagagaaggc	cagcggcccc	300
ctggggactc tg	ggcagagga	gctcagcagc	tacagccggc	ggaagggagg	cttcagcttc	360
cgcttcggcc gg	g					372
<210> 29						
<211> 27						
<212> DNA						
<213> Artific	cial Seque	ence				
<220>						
<223> Primer						
<400> 29						
cctcctctct c	tccctcctc	tgctcag			27	
<210> 30						
<211> 27						
<212> DNA						
<213> Artific	cial Seque	ence	-			
<220>						
<223> Primer			,			
<400> 30						
acggggcaga g	tccacgcag	gccctca			27	
<210> 31					•	
<211> 431		•				
<212> PRT						
<213> Human						
<400> 31						

Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Ile	Thr	Pro	Glu	G1n	Phe	Ser	Arg	Leu	Leu	Arg
1				5					10					15	
Asp	His	Asn	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	Tyr	Arg	Leu	Arg
			20					25					30		
Pro	Leu	Val	Tyr	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Arg	Ala	Lys	Leu	Ala	Leu
		35					40					45			
Val	Leu	Thr	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Ala	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Asn	Ala
	50					55					60				
Leu	Val	Phe	Tyr	Val	Val	Thr	Arg	Ser	Lys	Ala	Met	Arg	Thr	Val	Thr
65					70					75					80
Asn	Ile	Phe	Ile	Cys	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Thr	Phe
				85					90					95	
Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Ser	Asp	Asn	Trp	Leu
			100					105					110		
Gly	Gly	Ala	Phe	Ile	Cys	Lys	Met	Va1	Pro	Phe	Val	G1n	Ser	Thr	Ala
		115					120					125			
Val	Val	Thr	Glu	Ile	Leu	Thr	Met	Thr	Cys	Ile	Ala	Val	Glu	Arg	His
	130					135					140				
Gln	Gly	Leu	Val	His	Pro	Phe	Lys	Met	Lys	Trp	G1n	Tyr	Thr	Asn	Arg
145					150					155					160
Arg	Ala	Phe	Thr	Met	Leu	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ile	Val
				165					170					175	
Gly	Ser	Pro	Met	Trp	His	Val	Gln	Gln	Leu	Glu	Ile	Lys	Tyr	Asp	Phe
			180				•	185					190		
Leu	Tyr	Glu	Lys	Glu	His	Ile	Cys	Cys	Leu	Glu	Glu	Trp	Thr	Ser	Pro
		195					200					205			
Val	His	Gln	Lys	Ile	Tyr		Thr	Phe	Ile	Leu		Ile	Leu	Phe	Leu
	210					215					220				_
Leu	Pro	Leu	Met	Val	Met	Leu	Ile	Leu	Tyr	Ser	Lys	Ile	Gly	Tyr	Glu

225		230		235		240
Leu Trp Ile	Lys Lys	Arg Val	Gly Asp	Gly Ser	Val Leu	Arg Thr Ile
	245			250		255
His Gly Lys	Glu Met	Ser Lys	Ile Ala	Arg Lys	Lys Lys	Arg Ala Val
	260		265			270
Ile Met Met	Val Thr	Val Val	Ala Leu	Phe Ala	Val Cys	Trp Ala Pro
275			280		285	
Phe His Val	Val His	Met Met	Ile Glu	Tyr Ser	Asn Phe	Glu Lys Glu
290		295			300	
Tyr Asp Asp	Val Thr	Ile Lys	Met Ile	Phe Ala	Ile Val	Gln Ile Ile
305		310		315		320
Gly Phe Ser	Asn Ser	Ile Cys	Asn Pro	Ile Val	Tyr Ala	Phe Met Asn
	325	,		330		335
Glu Asn Phe	Lys Lys	Asn Val	Leu Ser	Ala Val	Cys Tyr	Cys Ile Val
	340		345			350
Asn Lys Thr	Phe Ser	Pro Ala	Gln Arg	His Gly	Asn Ser	Gly Ile Thr
355			360		365	
Met Met Arg	Lys Lys	Ala Lys	Phe Ser	Leu Arg	Glu Asn	Pro Val Glu
370		375			380	
Glu Thr Lys	Gly Glu	Ala Phe	Ser Asp	Gly Asn	Ile Glu	Val Lys Leu
385		390		395		400
Cys Glu Gln	Thr Glu	Glu Lys	Lys Lys	Leu Lys	Arg His	Leu Ala Leu
	405			410		415
Phe Arg Ser	Glu Leu	Ala Glu	Asn Ser	Pro Leu	Asp Ser	Gly His
	420	•	425			430
<210> 32						
<211> 1293						
<212> DNA						
<213> Human		٠				

<400> 32

atgcaggcgc ttaacattac cccggagcag ttctctcggc tgctgcggga ccacaacctg 60 acgcgggage agtteatege tetgtacegg etgegacege tegtetacae eccagagetg 120 ccgggacgcg ccaagctggc cctcgtgctc accggcgtgc tcatcttcgc cctggcgctc 180 tttggcaatg ctctggtgtt ctacgtggtg acccgcagca aggccatgcg caccgtcacc 240 aacatettta tetgeteett ggegeteagt gacetgetea teacettett etgeatteee 300 gtcaccatgc tccagaacat ttccgacaac tggctggggg gtgctttcat ttgcaagatg 360 gtgccatttg tccagtctac cgctgttgtg acagaaatcc tcactatgac ctgcattgct 420 gtggaaaggc accagggact tgtgcatcct tttaaaatga agtggcaata caccaaccga 480 agggetttea caatgetagg tgtggtetgg etggtggeag teategtagg ateacecatg 540 tggcacgtgc aacaacttga gatcaaatat gacttcctat atgaaaagga acacatctgc 600 tgcttagaag agtggaccag ccctgtgcac cagaagatct acaccacctt catccttgtc 660 atcetettee teetgeetet tatggtgatg ettattetgt acagtaaaat tggttatgaa 720 ctttggataa agaaaagagt tggggatggt tcagtgcttc gaactattca tggaaaagaa 780 840 atgtccaaaa tagccaggaa gaagaaacga gctgtcatta tgatggtgac agtggtggct ctctttgctg tgtgctgggc accattccat gttgtccata tgatgattga atacagtaat tttgaaaagg aatatgatga tgtcacaatc aagatgattt ttgctatcgt gcaaattatt 960 ggattttcca actccatctg taatcccatt gtctatgcat ttatgaatga aaacttcaaa 1020 aaaaatgttt tgtctgcagt ttgttattgc atagtaaata aaaccttctc tccagcacaa 1080 aggcatggaa attcaggaat tacaatgatg cggaagaaag caaagttttc cctcagagag 1140 aatccagtgg aggaaaccaa aggagaagca ttcagtgatg gcaacattga agtcaaattg 1200 tgtgaacaga cagaggagaa gaaaaagctc aaacgacatc ttgctctctt taggtctgaa 1260 ctggctgaga attctccttt agacagtggg cat 1293

<210> 33

<211> 432

<212> PRT

<213> Rat

<400> 33

Met Glu Ala Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Gly Ser Trp Pro Leu Gly

				5					10					15	
G1n	Asn	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Phe
			20					25					30		
Ser	Ser	Tyr	Tyr	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Met	Phe	Ile	Ala
		35					40					45			
Ala	Tyr	Val	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Cys	Met	Val	Gly	Asn	Thr	Leu	Va1
	50					55					60				
Cys	Phe	Ile	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	His	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Asn	Met
65					70					75					80
Phe	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Phe	Cys
				85					90					95	
Met	Pro	Thr	Thr	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Ile	Thr	Gly	Trp	Pro	Phe	Asp
			100					105					110		
Asn	Ala	Thr	Cys	Lys	Met	Ser	Gly	Leu	Val	Gln	Gly	Met	Ser	Val	Ser
		115					120					125			
Ala	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Val	Ala	Ile	Ala	Val	Glu	Arg	Phe	Arg	Cys
	130					135					140				
Ile	Val	His	Pro	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Leu	Phe
145					150					155					160
Thr	Ile	Ala	Val	Ile	Trp	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Ile	Met	Cys	Pro	Ser
			,	165	I				170)				175	
Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Arg	Glu	Glu	His	His	Phe	Met	Leu	Asp
			180					185	,				190		
Ala	Arg	Asn	Arg	Ser	Tyr	Pro	Leu	Tyr	Ser	Cys	Trp	Glu	Ala	Trp	Pro
		195	5				200)				205	,		
Glu	Lys	Gly	Met	Arg	Lys	: Val	Tyr	Thr	.Ala	Val	Leu	Phe	Ala	His	Ile
	210)				215	5				220)			
Туг	Leu	l Val	Pro	Leu	ı Ala	Leu	ı Ile	Val	Val	Met	Tyr	· Val	Arg	Ile	Ala
225	;				230)				235	;				240

Arg	Lys	Leu	Cys	G1n	Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	Arg	Asp	Thr	Glu	Glu	Ala
				245					250					255	
Val	Ala	Glu	Gly	Gly	Arg	Thr	Ser	Arg	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Val	His
			260					265					270		
Met	Leu	Val	Met	Val	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Leu	Pro	Leu
		275					280					285			
Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Asp	Tyr	G1y	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln
	290					295					300				
Leu	His	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Phe	Pro	Leu	Ala	His	Trp	Leu	Ala
305					310					315					320
Phe	Phe	His	Ser	Ser	Ala	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Asn	Glu
				325					330					335	
Asn	Phe	Arg	Arg	Gly	Phe	Gln	Ala	Ala	Phe	Arg	Ala	Gln	Leu	Cys	Trp
			340					345					350		
Pro	Pro	Trp	Ala	Ala	His	Lys	Gln	Ala	Tyr	Ser	Glu	Arg	Pro	Asn	Arg
		355					360					365			
Leu	Leu	Arg	Arg	Arg	Val	Val	Val	Asp	Val	Gln	Pro	Ser	Asp	Ser	Gly
	370					375					380				
Leu	Pro	Ser	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg
385					390					395					400
Leu	Pro	Leu	Arg	Asn	Gly	Arg	Val	Ala	His	Gln	Asp	Gly	Pro	Gly	Glu
				405					410					415	
Gly	Pro	Gly	Cys	Asn	His	Met	Pro	Leu	Thr	Ile	Pro	Ala	Trp	Asn	Ile
			420					425					430		
<21	0> 3	4													
<21	1> 1.	299	•												
<21	2> D	NA													
<21	3> R	at													

<400> 34

atggaggcgg	agccctccca	gcctcccaac	ggcagctggc	ccctgggtca	gaacgggagt	60
gatgtggaga	ccagcatggc	aaccagcctc	accttctcct	cctactacca	acactcctct	120
ccggtggcag	ccatgttcat	cgcggcctac	gtgctcatct	tcctcctctg	catggtgggc	180
aacaccctgg	tctgcttcat	tgtgctcaag	aaccggcaca	tgcgcactgt	caccaacatg	240
tttatcctca	acctggccgt	cagcgacctg	ctggtgggca	tcttctgcat	gcccacaacc	300
cttgtggaca	accttatcac	tggttggcct	tttgacaacg	ccacatgcaa	gatgagcggc	360
ttggtgcagg	gcatgtccgt	gtctgcatcg	gttttcacac	tggtggccat	cgctgtggaa	420
aggttccgct	gcatcgtgca	ccctttccgc	gagaagctga	cccttcggaa	ggcgctgttc	480
accatcgcgg	tgatctgggc	tctggcgctg	ctcatcatgt	gtccctcggc	ggtcactctg	540
acagtcaccc	gagaggagca	tcacttcatg	ctggatgctc	gtaaccgctc	ctacccgctc	600
tactcgtgct	gggaggcctg	gcccgagaag	ggcatgcgca	aggtctacac	cgcggtgctc	660
ttcgcgcaca	tctacctggt	gccgctggcg	ctcatcgtag	tgatgtacgt	gcgcatcgcg	720
cgcaagctat	gccaggcccc	cggtcctgcg	cgcgacacgg	aggaggcggt	ggccgagggt	780
ggccgcactt	cgcgccgtag	ggcccgcgtg	gtgcacatgc	tggtcatggt	ggcgctcttc	840
ttcacgttgt	cctggctgcc	actctgggtg	ctgctgctgc	tcatcgacta	tggggagctg	900
agcgagctgc	aactgcacct	gctgtcggtc	tacgccttcc	ccttggcaca	ctggctggcc	960
ttcttccaca	gcagcgccaa	ccccatcatc	tacggctact	tcaacgagaa	cttccgccgc	1020
			•		ccacaagcaa	
					cgtgcaaccc	
					gcctggccgg	
					gccaggctgc	
	ccctcaccat					1299
		-				

<210> 35

<211> 430

<212> PRT

<213> Human

⟨400⟩ 35

Met Glu Gly Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Ser Ser Trp Pro Leu Ser

1 5 10 15

WO 03/020932 PCT/JP02/08872 22/39

G1n	Asn	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Leu	Thr	Phe
			20					25					30		
Ser	Ser	Tyr	Tyr	Gln	His	Thr	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Met	Phe	Ile	Val
		35					40					45			
Ala	Tyr	Ala	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Cys	Met	Val	Gly	Asn	Thr	Leu	Val
	50					55					60				
Cys	Phe	Ile	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	His	Met	His	Thr	Val	Thr	Asn	Met
65					70					75					80
Phe	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Phe	Cys
				85					90					95	
Met	Pro	Thr	Thr	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Ile	Thr	Gly	Trp	Pro	Phe	Asp
			100					105					110		
Asn	Ala	Thr	Cys	Lys	Met	Ser	Gly	Leu	Val	Gln	Gly	Met	Ser	Val	Ser
		115					120					125			
Ala	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Val	Ala	Ile	Ala	Val	Glu	Arg	Phe	Arg	Cys
	130					135					140				
Ile	Val	His	Pro	Phe	Arg	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Leu	Va]
145					150					155					160
Thr	Ile	Ala	Val	Ile	Trp	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Ile	Met	Cys	Pro	Sei
				165					170					175	
Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Arg	Glu	Glu	His	His	Phe	Met	Val	Asp
			180					185					190		
Ala	Arg	Asn	Arg	Ser	Tyr	Pro	Leu	Tyr	Ser	Cys	Trp	Glu	Ala	Trp	Pro
		195					200					205			
Glu	Lys	Gly	Met	Arg	Arg	Val	Tyr	Thr	Thr	Val		Phe	Ser	His	Πe
	210					215					220				
-	Leu	Ala	Pro	Leu	Ala	Leu	Ile	Val	Val		Tyr	Ala	Arg	Ile	
225		_	_		230			_		235					240
Ara	Ive	Len	Cvs	Gln	Ala	Pro	G1 v	Pro	Ala	Pro	Glv	G] v	G111	Gln	Αls

Ala Asp Pro Arg Ala Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His Met Leu Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu Trp Ala Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Gln Leu Ser Ala Pro Gln Leu His Leu Val Thr Val Tyr Ala Phe Pro Phe Ala His Trp Leu Ala Phe Phe Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu Asn Phe Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Arg Leu Cys Pro Arg Pro Ser Gly Ser His Lys Glu Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Gly Gly Leu Leu His Arg Arg Val Phe Val Val Val Arg Pro Ser Asp Ser Gly Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Arg Pro Gly Arg Leu Pro Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His His Gly Leu Pro Arg Glu Gly Pro Gly Cys Ser His Leu Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asp Ile <210> 36 <211> 1290 <212> DNA <213> Human <400> 36

atggagggg agccctccca gcctcccaac agcagttggc ccctaagtca gaatgggact

aacactgagg ccaccccggc tacaaacctc accttctcct cctactatca gcacacctcc 120 180 cctgtggcgg ccatgttcat tgtggcctat gcgctcatct tcctgctctg catggtgggc aacaccctgg tetgttteat egtgeteaag aaceggeaca tgeatactgt caccaacatg 240 ttcatcctca acctggctgt cagtgacctg ctggtgggca tcttctgcat gcccaccacc 300 360 cttgtggaca acctcatcac tgggtggccc ttcgacaatg ccacatgcaa gatgagcggc ttggtgcagg gcatgtctgt gtcggcttcc gttttcacac tggtggccat tgctgtggaa 420 aggttccgct gcatcgtgca ccctttccgc gagaagctga ccctgcggaa ggcgctcgtc 480 accategoeg teatetggge cetggegetg eteateatgt gteectegge egteaegetg 540 600 acceptcacce gtgaggagca ccacttcatg gtggacgccc gcaaccectc ctaccetctc tactcctgct gggaggcctg gcccgagaag ggcatgcgca gggtctacac cactgtgctc 660 ttctcgcaca tctacctggc gccgctggcg ctcatcgtgg tcatgtacgc ccgcatcgcg 720 cgcaagetet gccaggeece gggeecggee eeeggggeg aggaggetge ggaecegega 780 gcatcgcggc gcagagcgcg cgtggtgcac atgctggtca tggtggcgct gttcttcacg 840 ctgtcctggc tgccgctctg ggcgctgctg ctgctcatcg actacgggca gctcagcgcg ccgcagctgc acctggtcac cgtctacgcc ttccccttcg cgcactggct ggccttcttc 960 aacagcagcg ccaaccccat catctacggc tacttcaacg agaacttccg ccgcggcttc 1020 caggeegect teegegeeeg cetetgeeeg egeegtegg ggageeacaa ggaggeetae 1080 tecgagegge eeggegget tetgeacagg egggtetteg tggtggtgeg geecagegae 1140 teeggetge cetetgagte gggeectage agtggggeec ceaggeeegg eegeeteeeg 1200 ctgcggaatg ggcgggtggc tcaccacggc ttgcccaggg aagggcctgg ctgctcccac 1260 1290 ctgcccctca ccattccagc ctgggatatc

<210> 37

<211> 1290

<212> DNA

<213> Human

<400> 37

atggagggg agccetecea geeteceaac agcagttgge ecctaagtea gaatgggaet 60 aacaetgagg ceaeceegge tacaaacete acetteteet ectaetatea geaeacetee 120 eetgtggegg ceatgtteat tgtggeetat gegeteatet teetgetetg eatggtggge 180

						•
aacaccctgg	tctgtttcat	cgtgctcaag	aaccggcaca	tgcatactgt	caccaacatg	240
ttcatcctca	acctggctgt	cagtgacctg	ctggtgggca	tcttctgcat	gcccaccacc	300
cttgtggaca	acctcatcac	tgggtggccc	ttcgacaatg	ccacatgcaa	gatgagcggc	360
ttggtgcagg	gcatgtctgt	gtcggcttcc	gttttcacac	tggtggccat	tgctgtggaa	420
aggttccgct	gcatcgtgca	ccctttccgc	gagaagctga	ccctgcggaa	ggcgctcgtc	480
accatcgccg	tcatctgggc	cctggcgctg	ctcatcatgt	gtccctcggc	cgtcacgctg	540
accgtcaccc	gtgaggagca	ccacttcatg	gtggacgccc	gcaaccgctc	ctacccgctc	600
tactcctgct	gggaggcctg	gcccgagaag	ggcatgcgca	gggtctacac	cactgtgctc	660
ttctcgcaca	tctacctggc	gccgctggcg	ctcatcgtgg	tcatgtacgc	ccgcatcgcg	720
cgcaagctct	gccaggcccc	gggcccggcc	cccgggggcg	aggaggctgc	ggacccgcga	780
gcatcgcggc	gcagagcgcg	cgtggtgcac	atgctggtca	tggtggcgct	gttcttcacg	840
ctgtcctggc	tgccgctctg	ggcgctgctg	ctgctcatcg	actacgggca	gctcagcgcg	900
ccgcagctgc	acctggtcac	cgtctacgcc	ttccccttcg	cgcactggct	ggccttcttc	960
aacagcagcg	ccaaccccat	catctacggc	tacttcaacg	agaacttccg	ccgcggcttc	1020
caggccgcct	tccgcgcccg	cctctgcccg	cgcccgtcgg	ggagccacaa	ggaggcctac	1080
tccgagcggc	ccggcgggct	tctgcacagg	cgggtcttcg	tggtggtgcg	gcccagcgac	1140
tccgggctgc	cctctgagtc	gggccctagc	agtggggccc	ccaggcccgg	ccgcctcccg	1200
ctgcggaatg	ggcgggtggc	tcaccacggc	ttgcccaggg	aagggcctgg	ctgctcccac	1260
ctgcccctca	ccattccagc	ctgggatatc				1290
<210> 38						
<211> 124						

<212> PRT

<213> Human

<400> 38

Met Arg Gly Phe Arg Pro Leu Leu Ser Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ala

10

Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Gly Pro Thr Asp Ile Gly Asp Ile

25

Gly Ala Arg Met Asn Trp Ala Gln Leu Ala Glu Gly His Pro Pro Asn

35	40	45	
Ser Val Gln Asn Pro Gln Pro	Gln Ala Leu Leu	Val Val Ala Arg	Glu
50 55		60	
Gln Gln Ala Ser His Arg Glu	His Thr Gly Phe	Arg Leu Gly Arg	Gln
65 70	75		80
Asp Gly Ser Ser Glu Ala Ala	Gly Phe Leu Pro	Ala Asp Ser Glu	Lys
85	90	95	
Ala Ser Gly Pro Leu Gly Thr	Leu Ala Glu Glu	Leu Ser Ser Tyr	Ser
100	105	110	
Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser	Phe Arg Phe Gly	Arg	
115	120	124	
<210> 39			
<211> 372			
<212> DNA			
<213> Human			
<400> 39			
atgaggggct tccggccttt gcttt	cccta cttctccctc	tgagtgcctg ctttc	ccctg 60
ctggacagaa ggggacccac agaca	teggt gacateggag	ccaggatgaa ctggg	gcccag 120
ctggctgagg gacatccccc caact	cggtt caaaatccac	agccacaggc cctgc	cttgtg 180
gtggccaggg agcagcaggc ctccc	acagg gagcacaccg	getteegtet aggga	aggcaa 240
gacggtagca gtgaggccgc agggt	tects eccecegact	cggagaaggc cagcg	ggccct 300
ctggggactc tggcagagga gctga	gcagc tacagccgga	ggaagggagg cttca	agcttc 360
cgctttggac gg			372
<210> 40	,		
<211> 27		•	•
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Primer			

<400> 40 27 atgaggggct tccggccttt gctttcc <210> 41 ⟨211⟩ 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Primer <400> 41 27 tcaccgtcca aagcggaagc tgaagcc <210> 42 <211> 134 <212> PRT <213> Bovine <400> 42 Met Arg Ser Pro Tyr Ser Leu Pro Tyr Leu Leu Phe Leu Pro Leu Gly 15 10 5 Ala Cys Phe Pro Val Leu Asp Thr Glu Glu Pro Val Asp Ala Val Gly 30 20 25 Gly Thr Gly Arg Glu Met Ser Trp Met Asp Pro Ala Arg Gly Arg Pro 45 35 40 Phe Pro Trp Gly Ser Pro Gly Trp Pro Arg Ala Pro Tyr Pro His Ala 60 55 50 Leu Leu Val Thr Ala Lys Glu Leu Arg Ala Ser Gly Lys Ala Arg Ala 75 70 65 Gly Phe Gln Leu Arg Leu Gly Arg Gln Asp Asp Gly Ser Glu Ala Thr

Gly Leu Leu Gly Glu Ala Glu Lys Val Gly Gly Leu Leu Gly Thr

105

110

85

100

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

28/39

Leu Ala Glu Glu Leu Asn Gly Tyr Ser Arg Lys Lys Gly Gly Phe Ser 115 120 125 Phe Arg Phe Gly Arg Arg 130 <210> 43 <211> 402 <212> DNA <213> Bovine <400> 43 atgcggagcc cttactccct gccctacctc ctgttcctgc ccctgggtgc ctgcttcccg gtgctggaca cagaggagcc tgtggatgcc gtagggggca ccggacgtga aatgagctgg 120 atggacccgg cgaggggacg cccctttccg tggggctccc ctgggtggcc gagagccccg 180 tacccacacg ccctgctcgt cacggccaag gagctgcggg cgtcaggcaa ggcgcgtgct 240 ggcttccagc tgcgtctcgg gaggcaggac gatggcagcg aggccactgg cctcctcctg 300 ggggaggccg agaaggtggg gggcctgttg ggaaccctgg ctgaggagct caatggctac 360 402 agcaggaaga aggggggctt cagcttccgc ttcggtcggc gg <210> 44 <211> 433 <212> PRT <213> Rat <400> 44 Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser 5 10 15 Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg 20 25 30 Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Val Ala Phe 35 40 45 Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser

55

50

60

PCT/JP02/08872

Leu	Val	Ile	Tyr	Val	Val	Thr	Arg	Ser	Lys	Ala	Met	Arg	Thr	Val	Thr
65					70					75					80
Asn	Ile	Phe	Ile	Cys	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Ala	Phe
				85					90					95	
Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Ser	Asp	Lys	Trp	Leu
			100				•	105					110		
G1y	Gly	Ala	Phe	Ile	Cys	Lys	Met	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Ser	Thr	Ala
		115					120					125			
Val	Val	Thr	Glu	Ile	Leu	Thr	Met	Thr	Cys	Ile	Ala	Val	Glu	Arg	His
	130	(135					140				
Gln	Gly	Leu	Val	His	Pro	Phe	Lys	Met	Lys	Trp	Ğ1n	Tyr	Thr	Thr	Arg
145					150					155					160
Arg	Ala	Phe	Thr	Ile	Leu	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Ala	Ala	Ile	Ile	Val
				165					170					175	
G1y	Ser	Pro	Met	Trp	His	Val	Gln	Arg	Leu	G1u	Ile	Lys	Tyr	Asp	Phe
			180					185					190		
Leu	Tyr	Glu	Lys	Glu	His	Ile	Cys	Cys	Leu	G1u	Glu	Trp	Ala	Ser	Pro
		195					200					205			
Val	His	Gln	Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ile	Leu	Val	Ile	Leu	Phe	Leu
	210					215					220				
Leu	Pro	Leu	Val	Val	Met	Leu	Val	Leu	Tyr	Ser	Lys	Ile	Gly	Tyr	Glu
225					230					235					240
Leu	Trp	Ile	Lys	Lys	Arg	Val	Gly	Asp	Ser	Ser	Ala	Leu	Gln	Thr	Ile
				245					250					255	
His	Gly	Lys	Glu	Met	Ser	Lys	Ile	Ala	Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Ala	Val
			260)				265					270		
Ile	Met	Met	Val	Thr	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Ala	Ala	Cys	Trp	Ala	Pro
		275					280					285			
Phe	His	Val	Val	His	Met	Met	. Val	G1u	Tyr	Ser	Asn	Phe	Glu	Lys	Glu

290 295 300	
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile	
305 310 315 320	
Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn	
325 330 335	
Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val	
340 345 350	
Lys Glu Ser Ser Pro Ala Arg Lys Pro Gly Asn Ser Gly Ile Ser	
355 360 365	
Met Met Gln Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Pro Gln Arg Pro Val Glu	
370 375 380	
Glu Thr Lys Gly Asp Thr Phe Ser Asp Ala Ser Ile Asp Val Lys Leu	
385 390 395 400	
Cys Glu Gln Pro Arg Glu Lys Arg Gln Leu Lys Arg Gln Leu Ala Phe	
405 410 415	
Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu	
420 425 430	
Leu	
<210> 45	
<211> 1299	
<212> DNA	
<213> Rat	
<400> 45	
atgcaggcgc tcaacatcac cgcggagcag ttctcccggc tgctgagcgc gcacaacct	
actcgggagc agttcattca tcgctatggg ctgagaccgc tggtctacac tccggagct	
cccgcgcgtg ctaaagtggc ctttgcgctg gcaggagcac tcatttttgc cctggcgct	
ttcggcaact ctctggtcat ctatgtggtg acccgcagca aggccatgcg caccgtcac	
aacatcttca tctgctctct ggcactcagt gatctgctca ttgccttctt ctgcatccc	
gtcacgatgc tccagaacat ctccgacaag tggctgggtg gtgccttcat ctgcaagat	g 360

gtaccctttg	tccagtccac	ggccgtcgtg	acagaaatcc	tcaccatgac	ctgcatcgct	420
gttgagaggc	accaaggact	tgtccatcct	tttaaaatga	agtggcagta	caccacccga	480
agggccttca	cgatcttggg	cgtggtctgg	ttggcggcca	tcatcgtagg	atcacccatg	540
tggcacgtgc	aacgccttga	gattaagtat	gacttcctct	atgaaaaaga	acacatctgc	600
tgcttggaag	aatgggccag	ccccgtgcac	cagagaatct	acagcacctt	cattctcgtc	660
atcctcttcc	tcctgcctct	tgtggtaatg	ctagtcctct	atagcaagat	tggctatgaa	720
ctgtggatca	agaagagagt	gggagacagt	tcagcgcttc	aaactatcca	cgggaaagaa	780
atgtccaaaa	tagccaggaa	gaagaagcgg	gctgtcatta	tgatggtgac	tgtggtggct	840
ctctttgctg	catgctgggc	acctttccac	gttgttcaca	tgatggttga	gtacagtaat	900
tttgaaaaaag	aatatgatga	tgtcacaatc	aagatggtct	ttgctgtcgc	gcagacaatt	960
ggctttttca	actccatctg	taatcccttt	gtgtatgcgt	ttatgaatga	aaacttcaaa	1020
aagaattttc	tgtctgctgt	ttgttattgc	atagtgaaag	aatcctcctc	cccagcacgg	1080
aagcctggga	attctggaat	atcaatgatg	cagaagagag	caaagttatc	tcgaccacag	1140
cgtccagtgg	aagaaaccaa	aggagacaca	ttcagtgatg	ccagcattga	tgtcaaattg	1200
tgcgagcagc	cgcgggagaa	aagacaactc	aagagacagc	tagccttctt	cagttctgaa	1260
ctttctgaaa	actctacttt	tggtagtggc	catgaactg			1299

<210> 46

<211> 436

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 46

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser 15 5

10

Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg 30 25

20 Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Leu Ala Phe

45 40 35

Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser

60 55 50

Leu	Val	IIe	Tyr	Val	Val	Thr	Arg	Ser	Lys	Ala	Met	Arg	Thr	Val	Thr
65					70					75					80
Asn	Ile	Phe	Ile	Cys	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Ala	Phe
				85					90					95	
Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Ser	Asp	Lys	Trp	Leu
			100					105					110		
Gly	Gly	Ala	Phe	Ile	Cys	Lys	Met	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Ser	Thr	Ala
		115					120					125			
Val	Val	Thr	Glu	Ile	Leu	Thr	Met	Thr	Cys	Ile	Ala	Val	G1u	Arg	His
	130					135					140				
Gln	G1y	Leu	Ile	His	Pro	Phe	Lys	Met	Lys	Trp	Gln	Tyr	Thr	Thr	Arg
145					150					155					160
Arg	Ala	Phe	Thr	Ile	Leu	Gly	Val	Val	Trp	Leu	Ala	Ala	Ile	Ile	Val
				165					170					175	
Gly	Ser	Pro	Met	Trp	His	Val	G1n	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Tyr	Asp	Phe
			180					185					190		
Leu	Tyr	Glu	Lys	Glu	His	Val	Cys	Cys	Leu	Glu	Glu	Trp	Ala	Ser	Pro
		195					200					205			
Met	His	Gln	Arg	Ile	Tyr	Thr	Thr	Phe	Ile	Leu	Val	Ile	Leu	Phe	Leu
	210					215					220				
Leu	Pro	Leu	Val	Val	Met	Leu	Val	Leu	Tyr	Ser	Lys	Ile	Gly	Tyr	Glu
225					230					235					240
Leu	Trp	Ile	Lys	Lys	Arg	Val	Gly	Asp	Ser	Ser	Ala	Leu	Gln	Thr	Ile
				245					250					255	
His	Gly	Lys	Glu	Met	Ser	Lys	Ile	Ala	Arg	Lys	Lys	Lys	Arg	Ala	Val
			260					265					270		
Val	Met	Met	Val	Thr	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Ala	Ala	Cys	Trp	Ala	Pro
		275					280					285			
Phe	His	Val	Val	His	Met	Met	Val	G1u	Tyr	Ser	Asn	Phe	Glu	Lys	Glu

290 295 300 Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile 305 310 315 320 Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn 325 330 335 Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val 340 345 350 Arg Glu Thr Phe Ser Pro Gly Gln Lys Pro Gly Asn Ser Gly Ile Ser 355 360 365 Met Met Gln Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Ser Gln Arg Pro Val Ala 375 Glu Ala Lys Gly Asp Leu Phe Ser Asp Ala Asn Val Asp Val Lys Leu 390 395 Cys Glu Gln Pro Gly Glu Lys Arg Gln Leu Lys Arg Gln Leu Ala Phe 405 410 Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu 420 425 430 Leu End Tyr Arg 435 <210> 47 <211> 1308 <212> DNA <213> Mouse <400> 47 atgcaggcgc tcaacatcac cgcggagcag ttttcccggc tgctgagcgc gcacaacctg 60 actogggaac agtteattea tegetatggg etgegacege tggtetaeae teeggagetg 120 cccgcgcgcg ctaaactggc ctttgcgctg gctggagcac tcatttttgc cctggcgctc tttggcaact ctctggtcat ctatgtggtg acccgcagca aggccatgcg caccgtcacc 240 aacatettea tetgetetet ggeacteagt gatetgetea ttgeettett etgeateece

gtcacgatgc	tccagaacat	ctccgacaag	tggctgggtg	gtgccttcat	ctgcaagatg	360
gtgcccttcg	tccagtccac	tgctgttgtg	acggaaatcc	tcaccatgac	ttgcatcgct	420
gttgagaggc	accaaggact	catccatcct	tttaaaatga	agtggcagta	cactacccga	480
agggctttca	caatcttggg	tgtggtctgg	ttggcagcca	tcatcgtagg	atcacccatg	540
tggcacgtac	aacgcctcga	gattaagtat	gacttcctct	atgagaaaga	acatgtctgc	600
tgtttggaag	agtgggccag	ccccatgcac	cagagaatct	acaccacctt	catcctcgtc	660
atcctcttcc	tcctgccgct	tgtggtgatg	cttgtcctct	acagcaagat	tggctatgaa	720
ctgtggatca	agaagagagt	tggagacagt	tcagcacttc	agactatcca	cgggaaagaa	780
atgtccaaaa	tagccaggaa	gaagaagcgg	gctgtcgtta	tgatggtgac	agtggtggct	840
ctcttcgctg	cgtgctgggc	acctttccat	gttgttcaca	tgatggttga	gtacagtaac	900
tttgaaaaag	agtatgatga	tgtcacaatc	aagatggttt	ttgctgttgc	acaaacaatt	960
ggctttttca	actccatctg	taatcccttt	gtgtatgcat	ttatgaatga	aaacttcaaa	1020
aagaattttt	tgtctgcggt	ttgttattgc	atagtaagag	aaaccttctc	cccaggacag	1080
aagcctggaa	attctgggat	ttcaatgatg	caaaagagag	caaagttatc	acgatcacag	1140
cgtccagtgg	cggaagccaa	aggagactta	ttcagcgatg	ccaacgttga	tgtcaaattg	1200
tgtgagcagc	caggggagaa	aaggcaactc	aagcgacagc	ttgccttctt	tagttctgaa	1260
ctttctgaaa	actctacttt	cggcagtgga	catgaactgt	aatatcga		1308
Z210\ 48		•				

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 48

atgcggagcc cttactccct gccctac

27

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>	
<223> Primer	
<400> 49	
tcaccgccga ccgaagcgga agctgaa	27
<210> 50	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 50	
cgtcgacgca tgcaggcgct caacatcacc gcg	33
<210> 51	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 51	
cactagttta cagttcatgg ccactaccaa aagta	35
<210> 52	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 52	
cgtcgacgca tgcaggcgct caacatcacc gcg	33

<210> 53

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

36/39

⟨211⟩ 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 53	
catcgatatt acagttcatg tccactgccg aaagta	36
<210> 54	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 54	
ccagaacatt tccgacaact g	21
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 55	
acagcggtag actggacaaa	20
<210> 56	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Probe	

<400> 56	
tgctttcatt tgcaagatgg tgcc	24
<210> 57	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 57	
cggaagcctg ggaattctg	19
<210> 58	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 58	
atgtgtctcc tttggtttct tcca	24
<210> 59	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Probe	
<400> 59	
agcaaagtta totogaccac agogtoca	28
<210> 60	
<211> 21	
<212> DNA	

WO 03/020932 PCT/JP02/08872

38/39

<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
< 400> 60	
agcacactgg cttccgtcta g	21
<210> 61	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 61	
cgctggcctt ctctgagtca	20
<210> 62	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Probe	
<400> 62	
aggcaggaca gtggcagtga agcc	24
<210> 63	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer	
<400> 63	
tgagagcttc acagccaca	19

WO 03/020932		PCT/JP02/08872
	39/39	

<210> 64

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 64

agctgaagcc gcctttctt

<210> 65 <211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

⟨400⟩ 65

aacctggctg aggagctcaa tggcta

26

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intérnational application No. PCT/JP02/08872

	FICATION OF SUBJECT MATTER		
	Cl' C12N15/12, C07K14/47, A61H		
[A61P43/00, C07K16/18, C12F		
According t	o International Patent Classification (IPC) or to both na	tional classification and IPC	
B. FIRI De	SEARCHED		
	ocumentation searched (classification system followed	ov classification symbols)	
Int.	Cl ⁷ Cl2N15/12, C07Kl4/47, A61	38/17, A61K39/395, A61	P25/00,
	A61P43/00, C07K16/18, C12F	21/02, G01N33/50, G01N3	33/15
1		•	
<u> </u>			
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the	extent that such documents are included	in the fields searched
1			
İ			
	ata base consulted during the international search (nam		
	sprot/PIR/GeneSeq, Genbank/EMB		
}	•		
C DOCE	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
C. DOCOM	TEN 13 CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where ap	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 02/20762 A2 (AMGEN INC.),		1-26,29,30
]	14 March, 2002 (14.03.02),		,,
[& US 2002/150977 A1		
]			
A	WO 00/29441 A (Takeda Chemic	al Industries, Ltd.),	1-26,29,30
	25 May, 2000 (25.05.00),		
		2001-149072 A	
]			
A	WO 01/16313 Al (SMITHKLINE E	BEECHAM P.L.C),	1-26,29,30
}	08 March, 2001 (08.03.01),		
]	& EP 1127118 A		*
, ,	WO 01/66124 NJ /Molecule Character	anl Industries	1-26,29,30
P,A	WO 01/66134 Al (Takeda Chemi Ltd.),	.car industries,	1-20,23,30
]	13 September, 2001 (13.09.01)		
[& JP 2002-233386 A	•	
[
]			
]			
	<u> </u>		<u> </u>
Furthe	r documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	
* Special	categories of cited documents:	"T" later document published after the inte	
"A" docum	ent defining the general state of the art which is not	priority date and not in conflict with t	he application but cited to
	I to be of particular relevance document but published on or after the international filing	understand the principle or theory und "X" document of particular relevance; the	claimed invention cannot be
date		considered novel or cannot be considered	red to involve an inventive
	ent which may throw doubts on priority claim(s) or which is a stablish the publication date of another citation or other	step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the	
special	reason (as specified)	considered to involve an inventive ste	p when the document is
1	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	combined with one or more other such combination being obvious to a person	
"P" docum	ent published prior to the international filing date but later	"&" document member of the same patent	
than th	e priority date claimed		
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sear	rch report
06 D	ecember, 2002 (06.12.02)	24 December, 2002	(24.12.02)
Name and n	nailing address of the ISA/	Authorized officer	
Japa	nese Patent Office		
_	·	m 11	
Facsimile N	о.	Telephone No.	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08872

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. X Claims Nos.: 374, 375
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: These claims substantially involve therapeutic methods to be practiced
on the human body.
-
a — a v a a a a a a a a
 Claims Nos.: 27, 28, 31, 32 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an
extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 27 and 31 relate to so-called screening method-specified compounds, while claims 28 and 32 relate to drugs containing compounds
specified by the function alone. Even though the statement of the
description is taken into consideration, it is completely unknown what
(continued to extra sheet)
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
because they are dependent claims and are not disafed in accordance with the second and third sentences of Yano 0.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)
·
1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable
claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers
only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. X No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 32
Remark on Protest
No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08872

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

specific substances are involved in the scope thereof and what are not. Thus, these claims are described in an extremely unclear manner.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet (1)

As stated in p. 1 in the description, it is recognized that the amino acid sequences and base sequences of G protein-coupled receptor proteins AQ27 and OT7T022 had been publicly known.

Although inventions relating to secretory proteins A to I and AQ27 receptors of rats, etc. are claimed in the claims, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Thus, the claims involve at least the following 12 groups inventions.

- (1) Inventions relating to secretory protein A of SEQ ID NO:1 (claims 1 to 32).
- (2) Inventions relating to secretory protein B of SEQ ID NO:3 (claims 33 to 68).
- (3) Inventions relating to secretory protein C of SEQ ID NO:4 (claims 69 to 104).
- (4) Inventions relating to secretory protein D of SEQ ID NO:5 (claims 105 to 140).
- (5) Inventions relating to secretory protein E of SEQ ID NO:6 (claims 141 to 176).
- (6) Inventions relating to secretory protein F of SEQ ID NO:23 (claims 177 to 212).
- (7) Inventions relating to secretory protein G of SEQ ID NO:27 (claims 213 to 261).
- (8) Inventions relating to secretory protein H of SEQ ID NO:38 (claims 262 to 297, 334 to 339).
- (9) Inventions relating to secretory protein I of SEQ ID NO:42 (claims 298 to 333, 340 to 345).
- (10) Inventions relating to rat AQ27 receptor of SEQ ID NO:44 (claims 347 to 371).
- (11) Inventions relating to mouse AQ27 receptor of SEQ ID NO:46 (claims 347 to 371).
- (12) Inventions relating to drugs containing human AQ27 receptors of SEQ ID NO:31 (claims 378 to 383).

(Claims 346, 372 to 373 and 376 to 377 are each involved in some of the above inventions containing the claim on which its depends.)

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int.Cl' C12N15/12, C07K14/47, A61K38/17, A61K39/395, A61P25/00, A61P43/00, C07K16/18, C12P21/02, G01N33/50, G01N33/15 調査を行った分野 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC)) Int.Cl' C12N15/12, C07K14/47, A61K38/17, A61K39/395, A61P25/00, A61P43/00, C07K16/18, C12P21/02, G01N33/50, G01N33/15 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語) Swissprot/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG) 関連すると認められる文献 引用文献の 関連する カテゴリー* 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 請求の範囲の番号 . PX WO 02/20762 A2 (AMGEN INC.) 2002.03.14 & US 2002/150977 A1 1-26, 29, 30 Α WO 00/29441 A (武田薬品工業株式会社) 2000.05.25 1-26, 29, 30& EP 1132405 A & JP 2001-149072 A WO 01/16313 A1 (SMITHKLINE BEECHAM P. L. C) 2001. 03. 08 Α 1-26, 29, 30& EP 1127118 A PA' WO 01/66134 A1 (武田薬品工業株式会社) 2001.09.13 1-26, 29, 30& JP 2002-233386 A □ C欄の続きにも文献が列挙されている。 □ パテントファミリーに関する別紙を参照。 * 引用文献のカテゴリー の日の後に公安された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す 出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日 の理解のために引用するもの 以後に公表されたもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以 文献 (理由を付す) 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに 「〇」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 よって進歩性がないと考えられるもの 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 「&」同一パテントファミリー文献 国際調査を完了した日 国際調査報告の発送日 06.12.02 24.12.02 国際調査機関の名称及びあて先 特許庁審査官(権限のある職員) 4 B 9162 潮 B本国特許庁(ISA/JP) 新見 浩一

郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4番3号 明細書第1頁に記載されているとおり、G蛋白質共役型レセプター蛋白質AQ27やOT7T022のアミノ酸配列や塩基配列は公知であると認められる。

請求の範囲には、分泌蛋白AないしI、ラット等のAQ27受容体に関連する発明が記載されて、いるが、それらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

よって、請求の範囲には、少なくとも、

- (1) 配列番号:1の分泌蛋白質Aに関連する発明(請求の範囲1-32)
- (2) 配列番号:3の分泌蛋白質Bに関連する発明(請求の範囲33-68)
- (3) 配列番号: 4の分泌蛋白質Cに関連する発明(請求の範囲69-104)
- (4) 配列番号:5の分泌蛋白質Dに関連する発明(請求の範囲105-140)
- (5)配列番号:6の分泌蛋白質Bに関連する発明(請求の範囲141-176)
- (6)配列番号:23の分泌蛋白質Fに関連する発明(請求の範囲177-212) (7)配列番号:27の分泌蛋白質Gに関連する発明(請求の範囲213-261)
- (8)配列番号:38の分泌蛋白質Hに関連する発明

(請求の範囲262-297, 334-339)

- (9) 配列番号: 42の分泌蛋白質Iに関連する発明 (請求の範囲298-333、340-345)
- (10) 配列番号: 44のラットAQ27受容体に関連する発明 (請求の範囲347-371)
- (11) 配列番号: 46のマウスAQ27受容体に関連する発明 (請求の範囲347-371)
- (12) 配列番号: 31のヒトAQ27受容体等を含有する剤に関連する発明 (請求の範囲378-383)
- の12の発明が記載されている。

(請求の範囲346,372-373、376-377は、同項が引用する請求項が含まれる上記いずれかの発明に包含される。)

成しなか	請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き) 第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作 っった。
1. 🗓	請求の範囲 <u>374,375</u> は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。 つまり、 実質的に人間の治療方法を包含している。
2. 🗓	請求の範囲 27,28,31,32 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、 請求の範囲 27及び31は、いわゆるスクリーニング方法特定化合物であり、請求の範囲28及び32は、機能のみにより特定された化合物を含有する医薬であり、明細書の記載を参酌しても、具体的にどのような物質が包含され、どのような物質が包含されないのか全く不明であり、同項の記載は著しく不明確である。
3. 🗌	請求の範囲は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に 従って記載されていない。
第Ⅱ欄	発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)
次に近	べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別	ページ参照
	· ·
1. 🗌	出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求 の範囲について作成した。
1. [] 2. []	
	の範囲について作成した。 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追
2.	の範囲について作成した。 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納
2. 3.	の範囲について作成した。 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納
2. 3.	の範囲について作成した。 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉 (1)) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)